

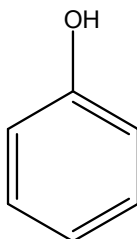
# CAPÍTULO 4

## COMPUESTOS FENÓLICOS

Sonia Z. Viña

### 1. Definición y propiedades generales

Los compuestos fenólicos son un grupo muy diverso de metabolitos secundarios que se caracterizan por poseer uno o más grupos hidroxilo (-OH), de reacción ácida, unidos a un anillo aromático (grupo fenol) (Figura 1). Los fenoles presentan comportamiento ácido dado que el oxígeno (-O) del grupo hidroxilo está fuertemente unido al anillo fenilo, mientras que el enlace relativamente débil entre el -O y el hidrógeno (-H) permite la disociación de un protón ( $H^+$ ) que puede ser liberado al medio, originando un ión fenolato cargado negativamente (Bowsher *et al.*, 2008: 364).



**Figura 1.** Grupo fenol característico de la estructura de los compuestos fenólicos

Actualmente, cerca de 10.000 compuestos fenólicos diferentes han sido identificados en la naturaleza y la mayoría de ellos son de origen vegetal.

Aunque el fenol como tal, libre, nunca ha sido encontrado en las plantas, su estructura puede usualmente reconocerse como componente de las moléculas correspondientes a los distintos compuestos fenólicos vegetales. Muchas sustancias fenólicas aparecen como derivados formados a partir de reacciones de condensación o adición.

Dado que una considerable proporción de esta clase de compuestos es sintetizada a partir de productos de la vía metabólica conocida como *vía fenilpropanoide*, los mismos son frecuentemente denominados *compuestos fenilpropanoides*. La estructura base de un compuesto fenilpropanoide corresponde a un anillo fenilo que presenta unida una cadena lateral de tres carbonos ( $C_6-C_3$ ).

Los llamados *polifenoles* son compuestos que presentan más de un grupo hidroxilo unido a uno o más anillos bencénicos. El término puede generar cierta confusión dado que lleva a considerar que se trata de polímeros cuyas unidades sillares son moléculas derivadas del fenol, aunque por otra parte dichos compuestos también existen (Vermerris y Nicholson, 2006: 2). En este último caso sería más apropiado hablar de *polímeros fenólicos*, incluyendo dentro de este grupo a las *ligninas* y a los *taninos*.

Para los científicos que trabajan en el laboratorio con muestras vegetales y también para la industria de frutas y hortalizas procesadas, los compuestos fenólicos pueden acarrear ciertos inconvenientes.

En primer lugar, son fácilmente oxidables en contacto con el oxígeno del aire a partir de reacciones catalizadas enzimáticamente, formando posteriormente complejos de color pardo-amarronado (*melanoides*). Este fenómeno se conoce como pardeamiento enzimático y es muy común en ciertas frutas y hortalizas, que se pardean con facilidad cuando son cortadas y expuestas al aire (Figura 2).

Durante el procesamiento, los productos son cortados, ocasionando la pérdida de la compartimentalización celular y favoreciendo la interacción entre las enzimas y sus correspondientes sustratos.

La enzima polifenoloxidasas (PPO) cataliza la hidroxilación de monofenoles y la oxidación de los difenoles resultantes a quinonas, utilizando oxígeno como co-sustrato. Las quinonas polimerizan luego originando pigmentos de color pardo (Baldwin y Bai, 2011: 102). Otra enzima que también posibilita la ocurrencia de este tipo de pardeamiento es la enzima peroxidasa (POD), catalizando la oxidación de compuestos fenólicos en presencia de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).



**Figura 2.** *Pardeamiento enzimático en manzana*

Para evitar la ocurrencia de este fenómeno y el aspecto desagradable que imparte a los productos vegetales procesados, en la industrialización de los mismos se lleva a cabo una inactivación por calor de las enzimas que lo propician, tratamiento conocido como *escaldado*. La acidificación del medio y el uso de agentes antioxidantes y quelantes, empleando por ejemplo ácido ascórbico, cítrico, málico, tartárico, succínico, constituyen también herramientas para reducir la incidencia del pardeamiento enzimático.

Sin embargo, en el procesamiento de otros productos como el té, el café, los dátiles o el cacao, es necesario que el fenómeno de pardeamiento enzimático se lleve a cabo para que los mismos desarrollen sus características sensoriales deseables (Gil *et al.*, 2005: 155).

Algunos compuestos fenólicos forman complejos con las proteínas e inhiben por lo tanto la actividad de ciertas enzimas. Los protocolos para el aislamiento de proteínas en el laboratorio incluyen pasos específicos necesarios para minimizar la interferencia de las sustancias fenólicas (Croteau *et al.*, 2000: 1250).

Es sabido también que los cultivos de tejidos vegetales pueden generar compuestos fenólicos que inhiben el crecimiento de callos (*callus*) y la

regeneración de plántulas. El cultivo de tejidos es una técnica que consiste básicamente en aislar una porción de la planta (*explanto*) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas necesarias para que las células expresen su potencial. Los callos se originan por la proliferación de células parenquimáticas que no presentan un patrón predecible de organización, se localizan en centros de actividad meristemática y frecuentemente aparecen en regiones cambiales rudimentarias, con zonas de diferenciación vascular. Una característica importante de los callos, desde un punto de vista funcional, es su crecimiento irregular, pudiendo potencialmente desarrollar raíces, brotes y embriones que forman plántulas (Lallana y Lallana, 2003: 81).

La mayoría de los compuestos fenólicos son hidrosolubles, solubles en solventes polares. La solubilidad en agua aumenta generalmente al aumentar el número de grupos hidroxilo. Además, en muchos casos los compuestos fenólicos se encuentran combinados con azúcares formando *glicósidos*<sup>1</sup>, favoreciendo la afinidad con el agua.

Si bien gran parte de los integrantes del grupo son hidrosolubles, hay algunas excepciones: la subclase de los *fenilpropenos* se caracteriza por ser soluble en solventes no polares mientras que la *lignina*, un polímero fenólico de estructura compleja, es una sustancia prácticamente insoluble, que se desarrolla como una impregnación de las paredes celulares vegetales.

Gran parte de los compuestos fenólicos se localizan en las vacuolas celulares, por su condición de ser compuestos hidrosolubles.

Otra propiedad común al grupo es que dan positiva la reacción de caracterización con  $\text{FeCl}_3$ , originando coloración verde, azul o negra según el compuesto involucrado. El  $\text{FeCl}_3$  es por lo tanto un reactivo general empleado para la detección de compuestos fenólicos en extractos vegetales (Figura 3).



**Figura 3.** *Reacción de identificación con  $\text{FeCl}_3$ . A la izquierda se observa un extracto vegetal conteniendo compuestos fenólicos y a la derecha el mismo extracto, al que se le han agregado gotas de solución de  $\text{FeCl}_3$  al 5%*

## 2. Funciones

Existe cada vez más evidencia que lleva a considerar que los aspectos funcionales de los compuestos fenólicos deben ser analizados tomando como referencia la distinción entre compuestos primarios y secundarios (Strack, 1997: 387).

Por ejemplo, es sabido que muchos metabolitos secundarios son valiosos vehículos para el almacenamiento y que son también elementos indispensables en ciertas estructuras anatómicas y morfológicas (Strack, 1997: 387). Pero hay asimismo un creciente conocimiento acerca de que los compuestos fenólicos son también de importancia ecológica fundamental para la supervivencia de las plantas. Si no contaran con los compuestos secundarios, muy probablemente las plantas no habrían evolucionado hacia tan amplio rango de especies

diferentes y no podrían haber sido capaces de mantener su coexistencia en los diferentes hábitats.

Las funciones biológicas de los compuestos fenólicos vegetales son muchas y muy variadas, comprendiendo desde sustancias odoríferas y pigmentos que atraen a los agentes polinizadores, venenos y disuasorios alimentarios (algunos son tóxicos para mamíferos e insectos), compuestos alelopáticos, componentes estructurales y agentes antifúngicos y antimicrobianos. Varios fenólicos cumplen funciones específicas para la planta, como inhibidores de la germinación, protectores contra la radiación ultravioleta (UV), moléculas de señalización, entre otros roles.

Algunos compuestos fenólicos revisten gran importancia como materiales que contribuyen al soporte de las células. Forman parte integral de la estructura de las paredes celulares, principalmente los materiales poliméricos tales como ligninas, cutinas y suberinas, que actúan como soporte mecánico y barreras contra la invasión microbiana (Strack, 1997: 388).

La lignina, en particular, constituye un material estructural componente de las paredes celulares vegetales. Luego de la celulosa, es el segundo compuesto orgánico más abundante sobre la Tierra. Se ha postulado que su síntesis fue la que permitió a las plantas pasar desde un ambiente acuático a uno terrestre, durante su evolución. Como ya se ha mencionado anteriormente, constituye una impregnación de la pared celular que, junto con la celulosa, otorga rigidez a los tejidos, posibilita el crecimiento en altura y la conducción de agua a través de los elementos anatómicos de conducción: las traqueidas (en Gimnospermas) y los miembros de vasos leñosos (en Angiospermas) que conforman el xilema. Recordemos que estos elementos deben soportar, en muchos casos, elevadas presiones negativas. Desde otro punto de vista, la prácticamente nula digestibilidad de la lignina para la mayoría de los organismos la convierte en un efectivo disuasorio alimentario. Muchos herbívoros evitan el consumo de materiales lignificados simplemente porque se trata de productos altamente resistentes al ataque mecánico y enzimático.

En cuanto a las funciones biológicas que desempeñan, los compuestos fenólicos forman parte de los denominados *mecanismos químicos de defensa*

contra ciertos herbívoros y microorganismos patógenos. Pueden actuar como antibióticos y pesticidas naturales.

Los herbívoros reaccionan sensiblemente al contenido de compuestos fenólicos en las plantas. Los ácidos fenólicos simples, como así también los taninos complejos y las resinas fenólicas son eficientes disuasorios, como por ejemplo en las interacciones entre ciertas aves y plantas donde los fenólicos interfieren en el proceso de digestión a nivel de la microflora del ciego (Strack, 1997: 388).

Determinados fenólicos pueden acumularse como compuestos inducibles de bajo peso molecular denominados *fitoalexinas*, a modo de respuesta frente a un ataque microbiano. Las plantas son capaces de identificar o reconocer este ataque detectando moléculas que son sintetizadas por los parásitos, las que reciben el nombre de *elicitores*.

En base a lo expuesto, es de destacar que las fitoalexinas son de naturaleza post-infeccional y que, aunque pueden estar presentes de antemano en bajas concentraciones en la planta, se acumulan rápidamente como compuestos inducidos luego de un daño o un ataque. Contrariamente, las llamadas toxinas pre-infeccionales son compuestos constitutivos de las plantas. Están presentes en los tejidos sanos, en concentraciones lo suficientemente altas como para protegerlos de una posible infección (Strack, 1997: 389). En este caso suelen ser denominadas *fitotoxinas*.

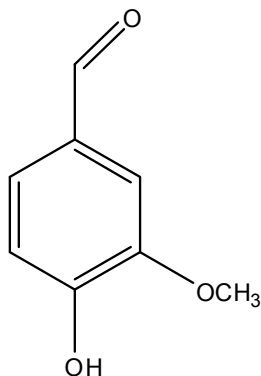
Dentro del grupo de los compuestos fenólicos que actúan como fitoalexinas y/o fitotoxinas, las hidroxycumarinas y los conjugados hidroxycinamatos revisten importancia. Como ya se ha mencionado anteriormente, contribuyen a los mecanismos de resistencia a las enfermedades en las plantas.

Los compuestos fenólicos pueden acumularse en respuesta a muy diversos factores de estrés. Hay una fuerte evidencia de que la radiación UV causante de daños en el ácido desoxirribonucleico (ADN) induce la acumulación de flavonoides y otros compuestos fenólicos capaces de absorber radiación comprendida en dicha franja del espectro electromagnético (entre longitudes de onda que abarcan los 200 y 400 nm). Esto ocurre principalmente en los tejidos epidérmicos de las plantas.

Los flavonoides, especialmente las antocianinas, pueden aparecer transitoriamente durante la ontogenia vegetal. Esto puede observarse en plántulas y hojas jóvenes y sugiere, al menos como especulación, que podrían desempeñar funciones fisiológicas relacionadas con la percepción de la luz (Strack, 1997: 388).

Dado que algunos cumplen roles como pigmentos y co-pigmentos y otros contribuyen a ciertos aromas y sabores característicos de algunas especies vegetales, determinados compuestos fenólicos actúan como atrayentes de agentes polinizadores y dispersores de frutos y semillas. La función más significativa de los pigmentos flavonoides (un grupo muy numeroso de compuestos fenólicos), especialmente las antocianinas junto con las flavonas y flavonoles como co-pigmentos, es su contribución a la coloración de órganos vegetales tales como flores y frutos. De allí surge su relevancia en los procesos de polinización y dispersión de semillas.

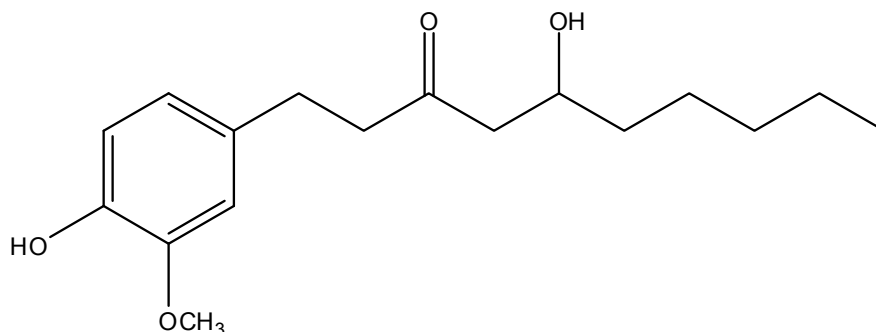
Los derivados volátiles del ácido benzoico están presentes en las esencias florales de más de un centenar de especies pertenecientes a 30 familias botánicas diferentes y ellos actúan como atrayentes de polinizadores. Por ejemplo, la vainillina (Figura 4), es un componente de esencias presente en las flores de las orquídeas *Vanilla planifolia*, *V. pompona* y *V. tahitiensis* (Bowsher, et al., 2008: 364). Su *flavor*<sup>2</sup> contribuye también a la dispersión de frutos de varias especies.



**Figura 4.** Estructura química de la vainillina o 3-metoxi-4-hidroxibenzaldehído



Los sabores y aromas producidos por los compuestos fenólicos comprenden desde los placenteros y agradables correspondientes a las vainillinas, a los pungentes del jengibre (gingeroles) (Figura 5), los pimientos (capsaicina<sup>3</sup>) y la astringencia<sup>4</sup> que aportan los taninos.



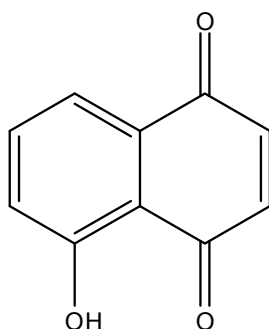
**Figura 5.** Estructura química del compuesto gingerol

Los sabores amargos tienden a repeler a la mayoría de los herbívoros y la astringencia afecta marcadamente la palatabilidad. Por ejemplo, el ganado evitará consumir plantas que contengan un alto tenor de taninos.

Algunos de los fenólicos aromáticos se emplean como agentes saborizantes en alimentos, tales como el eugenol presente en el clavo de olor (*Eugenia caryophyllata*), el cinamaldehído de la canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y la miristicina de la nuez moscada (*Myristica fragans*) (Bowsher *et al.*, 2008: 364). Cabe señalar sin embargo, que la mayoría de los componentes de los aceites esenciales extraídos a partir de especies aromáticas pertenecen al grupo de los terpenoides, que serán analizados más adelante en este libro (Capítulo 5).

En ciertas circunstancias, algunos compuestos fenólicos son sintetizados por determinadas especies vegetales y pueden afectar el crecimiento de otras plantas que competirían por espacio físico, luz, agua y nutrientes. Los compuestos fenólicos pueden influir en la competencia entre plantas y pueden por lo tanto comportarse como *sustancias alelopáticas*. Existen compuestos fenólicos hidrosolubles, tóxicos, tales como fenoles simples (por ejemplo: hidroquinona), hidroxibenzoatos e hidroxicinamatos que actúan de la manera descrita.

Una toxina conocida aislada a partir de especies del género *Juglans* es la juglona (5-hidroxi-naftoquinona) (Figura 6), que resulta altamente tóxica para un amplio grupo de especies vegetales. En la planta se la encuentra como un glicósido, que carece de toxicidad pero que se activa por hidrólisis y oxidación luego de su liberación a partir de las hojas, cuando éstas alcanzan el suelo.



**Figura 6.** Estructura química de la juglona

Existen también compuestos fenólicos presentes en exudados de raíces, que pueden actuar como toxinas. La especie *Parthenium argentatum* de la familia *Asteraceae*, conocida como guayule y productora de un caucho natural, exuda cinamato. Este compuesto resulta tóxico para la misma planta, ocasionando un fenómeno de autotoxicidad. El cinamato puede reducir la competencia entre miembros de la misma especie o de especies diferentes (Strack, 1997: 389).

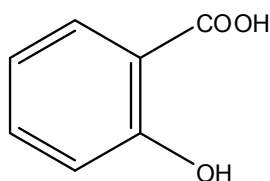
Muchos fenólicos simples están involucrados en las interacciones bioquímicas entre plantas. Algunos otros ejemplos comprenden a los ácidos siríngico, cafeico y ferúlico, que por constituir compuestos solubles en agua son rápidamente liberados a partir de las hojas y raíces al suelo circundante, donde actúan como inhibidores de la germinación. Estos compuestos alelopáticos se acumulan en especies como *Pteridium aquilinum*. Llamativamente hay también cierta evidencia de auto-envenenamiento, dado que esta especie de helecho puede llegar a degenerar luego de varios años de crecer en el mismo terreno (Bowsher *et al.*, 2008: 365).

Los hallazgos más recientes, referidos a la función de los compuestos fenólicos (y más específicamente de los flavonoides) se relacionan con el rol que

desempeñan como moléculas señal (o como sustancias de reconocimiento de hospedantes) en la interacción entre bacterias fijadoras del nitrógeno atmosférico y ciertos miembros de la familia Leguminosas (*Fabaceae*). Estas plantas exudan flavonoides que actúan selectivamente en los rizobios como inductores de la transcripción de genes asociados a la nodulación, activando ciertas proteínas reguladoras.

La gran mayoría de los ejemplos mencionados constituyen claras ilustraciones de las *funciones ecológicas* que los compuestos fenólicos pueden llevar a cabo.

Por otra parte el ácido salicílico (Figura 7), un representante del grupo de los fenólicos, actúa como un regulador clave en el desarrollo vegetal y en la activación de respuestas defensivas por parte de las plantas. Es sabido que este compuesto se presenta como una molécula señal ampliamente distribuida para la inducción sistémica de genes que expresan proteínas relacionadas con la resistencia y con la respuesta oxidativa que precede a la muerte celular, durante el ataque de patógenos (Bowshe *et al.*, 2008: 365), entre otras funciones muy importantes.



**Figura 7.** Estructura química del ácido salicílico

### 3. Clasificación

Existen diversos criterios para clasificar a los compuestos fenólicos. En el presente capítulo se dará una versión resumida de los distintos grupos que comprenden. No se pretende dar un detalle completo de las numerosas clases

que abarca este grupo tan diverso, sino sólo señalar algunos de los ejemplos más relevantes desde nuestro punto de vista.

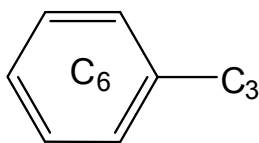
Se describirán a continuación las principales características de los grupos más abundantes de compuestos fenólicos vegetales, entre ellos: fenólicos simples, flavonoides y estilbenos, ligninas, taninos.

### 3.1. Compuestos fenólicos simples

Los fenólicos simples abarcan a su vez tres grupos de relevancia: los fenilpropanoides simples, las cumarinas y los derivados del ácido benzoico.

#### 3.1.1. Fenilpropanoides

Los fenilpropanoides simples comparten la estructura fundamental fenilpropanoide, portando una cadena lateral, lineal, de tres átomos de carbono que se encuentra unida al anillo fenilo constituido por seis carbonos (Figura 8). Los fenilpropanoides representan las unidades centrales que componen a prácticamente todos los compuestos fenólicos.



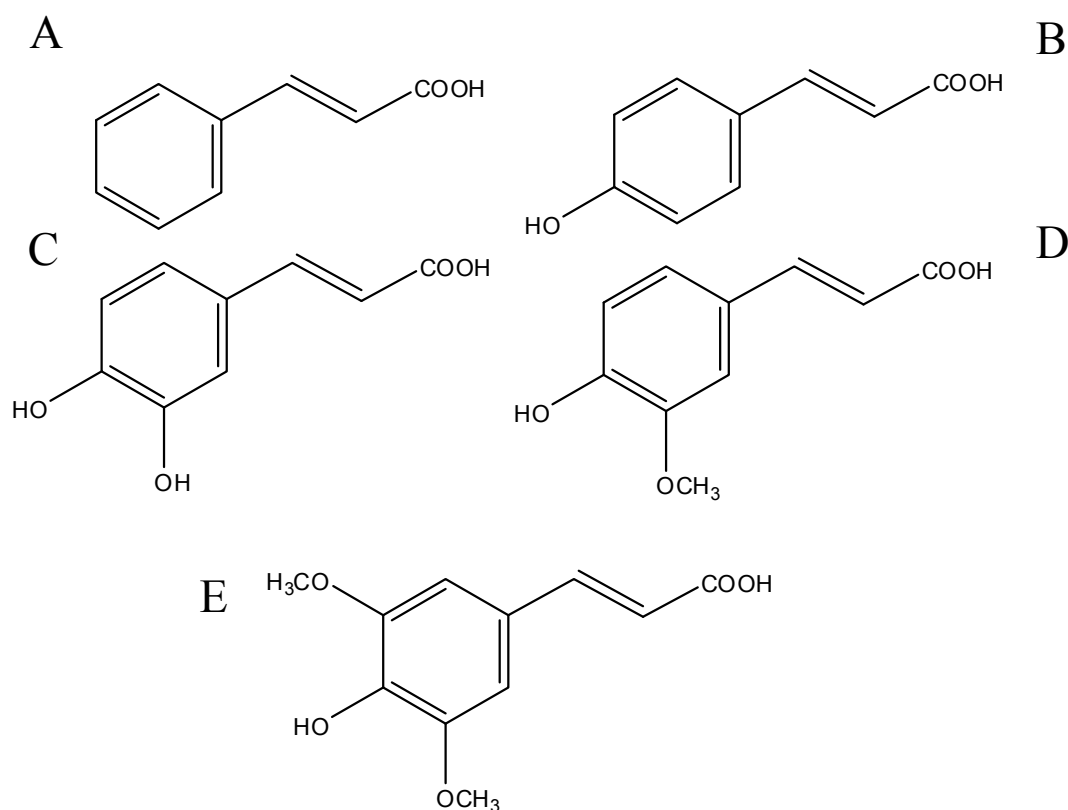
**Figura 8.** Estructura general de los compuestos fenilpropanoides

Algunos ejemplos comprendidos dentro de este grupo corresponden a los ácidos: cinámico, *p*-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico (Figura 9 A-E).

Los aniones cumarato, cafeato, ferulato y sinapato reciben colectivamente el nombre de *hidroxicinamatos* y se acumulan frecuentemente en las plantas como derivados conjugados<sup>5</sup>, manteniendo la estructura  $C_6-C_3$ . Los principales

tipos de conjugados son los ésteres y amidas. Los glicósidos aparecen menos frecuentemente.

Ciertas formas insolubles de los hidroxicinamatos se presentan unidas a polímeros tales como cutinas y suberinas, ligninas o polisacáridos en las paredes celulares (Strack, 1997: 397).



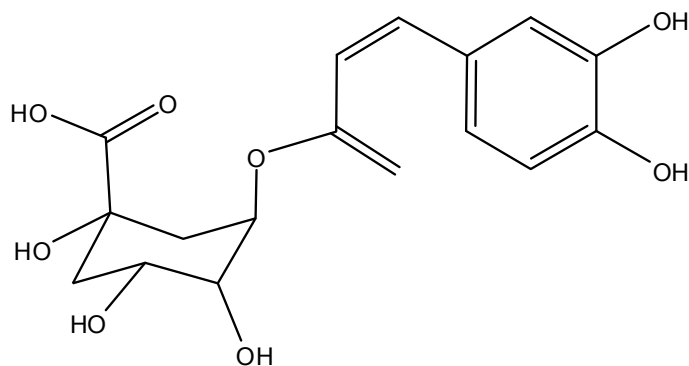
**Figura 9.** Estructuras químicas de los ácidos: cinámico (A), *p*-cumárico (B), cafeico (C), ferúlico (D) y sinápico (E)

Los ácidos *p*-cumárico, cafeico y ferúlico se acumulan frecuentemente como sus respectivos ésteres tartrato: los ácidos cutárico, caftárico y fertárico (Crozier *et al.*, 2006: 12).

Asimismo, muchas frutas y hortalizas presentan en su composición ciertos derivados del ácido cafeico conjugado con el ácido quínico, entre ellos los ácidos clorogénicos. Según Crozier *et al.* (2006: 12) los ácidos clorogénicos

representan aproximadamente un 10% de las hojas de la yerba mate (*Ilex paraguariensis*) y de las semillas procesadas del café robusta (*Coffea canephora*), una especie de café originaria del África occidental.

El ácido clorogénico (Figura 10) actúa como antioxidante e inhibidor de carcinógenos, sin embargo su presencia en semillas oleaginosas y en granos puede acarrear problemas nutricionales. Cuando se encuentra en concentraciones comprendidas entre 2-4% en productos que se incorporan a las raciones para el ganado, tales como la harina de girasol remanente de la extracción de aceite, puede afectar la actividad de enzimas hidrolíticas e interferir en la digestión y asimilación de proteínas, aminoácidos y minerales. Tales inconvenientes buscan resolverse mediante el desarrollo y selección de variedades de girasol con bajo contenido de ácido clorogénico o bien ensayando tecnologías que permitan remover dicho compuesto a partir de la harina de girasol (Makkar *et al.*, 2007: 89). Las semillas de colza y sus productos derivados pueden presentar inconvenientes similares.



**Figura 10.** Estructura química del ácido clorogénico o ácido 3-O-cafeoilquínico

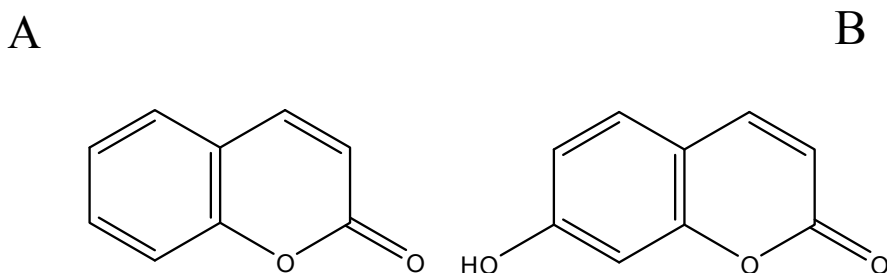
Se ha señalado cierta correlación entre la distribución de los conjugados hidroxycinamatos y el ordenamiento y clasificación sistemática de las especies vegetales. Por ejemplo, los clorogenatos son comunes en las familias

*Asteraceae*, *Solanaceae* y *Rubiaceae*. Otro ejemplo es la ocurrencia característica de un éster sinapato, la *sinapilcolina* (sinapina), en *Brassicaceae*. Como se ha referido previamente, compuestos fenilpropanoides simples tales como los ácidos cafeico y ferúlico se encuentran en el suelo en cantidades significativas y se ha evaluado experimentalmente que son capaces de inhibir la germinación y el crecimiento de diversas plantas.

### 3.1.2. Cumarinas e hidroxycumarinas

Este grupo de compuestos fenólicos simples también presentan el esqueleto básico fenilpropanoide, pero difieren de los fenilpropanoides simples en que la cadena lateral forma una estructura cíclica, un anillo. Corresponden a lactonas<sup>6</sup> fenilpropanoides.

Algunos ejemplos que pueden mencionarse incluyen a la cumarina, la umbeliferona (7-hidroxycumarina) (Figura 11 A y B), la esculetina (6,7-dihidroxycumarina) y la escopoletina (7-hidroxi-6-metoxicumarina). Se ha mencionado que los dos últimos compuestos se originarían por adición de sustituyentes oxigenados al anillo aromático de la umbeliferona (Sollai *et al.*, 2008: 2187).

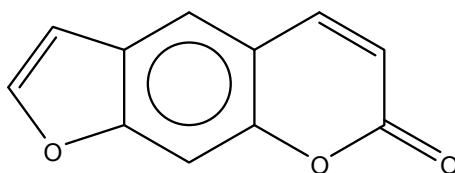


**Figura 11.** Estructura química de la cumarina (A) y de la 7-hidroxycumarina o umbeliferona (B)

Dentro de las cumarinas policíclicas suele describirse como un subgrupo al de las *furanocumarinas*. Dichos compuestos contienen un anillo furano unido al grupo fenilo, como puede observarse en la estructura del psoraleno (Figura 12),

un representante de este grupo de sustancias. Otros ejemplos de furanocumarinas son el metoxipsoraleno, la xantotoxina, el bergapteno y la esfondina (Bowsher *et al.*, 2008: 365).

Son particularmente tóxicos cuando resultan activados por la incidencia de luz ultravioleta A<sup>7</sup>. Una vez activados, adquieren la propiedad de unirse a las bases nitrogenadas derivadas de la pirimidina (citosina y timina) que componen los nucleótidos del ADN. Este fenómeno produce el bloqueo de la transcripción a ácido ribonucleico (ARN) y de los mecanismos de reparación del ADN, conduciendo en última instancia a la muerte de las células (Taiz y Zeiger, 2010: 377).



**Figura 12.** Estructura química del psoraleno, una furanocumarina

Esta clase de compuestos son especialmente abundantes en plantas de la familia *Apiaceae* (*Umbelliferae*). Algunas especies vegetales que sintetizan furanocumarinas son el apio (*Apium graveolens*), el perejil (*Petroselinum crispum*), la chirivía (*Pastinaca sativa*) y la maleza *Heracleum mantegazzianum*.

En ciertas ocasiones, las furanocumarinas activadas son causantes de severas reacciones en la piel. Por ejemplo, el personal dedicado a la cosecha de plantas de apio, en especial de ciertos materiales que tienen la capacidad de acumular furanocumarinas en altas concentraciones, puede presentar reacciones adversas frente a la presencia de estas sustancias si no se toman las medidas de precaución necesarias.

Algunas furanocumarinas son compuestos constitutivos de las plantas, mientras que otras se forman después de una infección o por efecto del daño mecánico, es decir que se trata en este caso de fitoalexinas.



Se ha mencionado que en el apio, la concentración de estos compuestos puede incrementarse considerablemente si la planta sufre algún tipo de estrés o es afectada por patógenos (Taiz y Zeiger, 2010: 377).

Según Bowsher *et al.* (2008: 364), existen algunas orugas que son capaces de alimentarse de plantas que contienen furanocumarinas. La estrategia desarrollada para protegerse de dichos compuestos consiste en este caso en enrollarse ellas mismas en el interior de las hojas, a fin de resguardarse de la luz solar hasta que la digestión haya sido completada.

### 3.1.3. Derivados del ácido benzoico

Los compuestos fenólicos derivados del ácido benzoico presentan una estructura  $C_6-C_1$ , como se observa en las estructuras químicas de la vainillina (Figura 4) y del ácido salicílico (Figura 7).

El nombre del ácido salicílico deriva de *Salix* dado que fue aislado por primera vez a partir de este género botánico. Ya ha sido mencionado que el ácido salicílico funciona como una molécula señal que activa la expresión de enzimas que participan en varios mecanismos de defensa. Muchas plantas muestran un incremento en el contenido de ácido salicílico luego de ser infectadas por virus, hongos, ser expuestas a la radiación UV o a estrés por ozono ( $O_3$ ) (Heldt, 2005: 439).

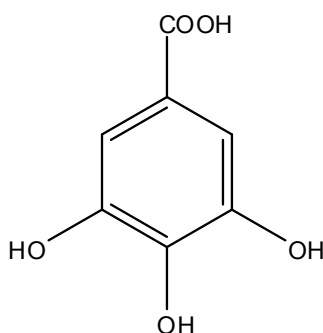
El ácido salicílico está directamente involucrado en el crecimiento vegetal, en la termogénesis<sup>8</sup>, la inducción floral y la captura de iones. Afecta la biosíntesis de etileno, el movimiento estomático y puede revertir la acción del ácido abscísico sobre la abscisión foliar. Otros roles asignados a este compuesto tienen que ver con el incremento en los niveles de clorofila y pigmentos carotenoides, la tasa fotosintética y las variaciones en la actividad de algunas enzimas celulares (Hayat *et al.*, 2007: 1).

Se ha comprobado que una dosis determinada de ácido salicílico puede proveer a una planta de una mejor protección contra patógenos. Este principio ha sido usado comercialmente: un análogo del ácido salicílico puede ser

aplicado en pulverizaciones sobre plantas de trigo para prevenir la infección del mildew (Heldt, 2005: 439).

Como integrantes de este grupo también se menciona a los ácidos gálico (Figura 13) y a su derivado, el ácido elágico. Estos últimos compuestos (también designados como ácidos fenólicos e hidroxibenzoatos) son componentes de una clase de taninos, los llamados *taninos hidrolizables*.

La denominación dada al ácido gálico deriva del término francés *galle*, que significa “agalla”.



**Figura 13.** Estructura química del ácido gálico, componente de taninos hidrolizables

Las *agallas* o *cecidias* (Figura 14) corresponden a estructuras anormales de los tejidos u órganos vegetales, generadas como respuesta a la presencia o actividad de un organismo inductor (generalmente un insecto). La planta reacciona básicamente con un desarrollo anormal o patológico de sus células, tejidos u órganos. El agente inductor o cecidógeno utiliza la agalla como un medio para nutrirse y protegerse del medio ambiente y de sus enemigos naturales.

La característica distintiva de las agallas, que las diferencia de otras anomalías que pueden presentarse en los tejidos vegetales, es que la reacción de la planta ante el ataque del organismo foráneo involucra procesos de hiperplasia (multiplicación anormal de las células) e hipertrofia (crecimiento anormal de las mismas) (Nieves-Aldrey, 1998: 4).



**Figura 14.** *Agallas en tejidos vegetales*

Se conocen más de 13.000 especies de insectos inductores de agallas. Más del 90% atacan a plantas Angiospermas. Los mismos incluyen insectos picadores (tisanópteros, hemípteros y especialmente homópteros) y representantes de otros órdenes de insectos (coleópteros, lepidópteros, dípteros e himenópteros). En el primer caso, la formación de agallas está relacionada básicamente con la alimentación; para los insectos del segundo grupo, las agallas se desarrollan en las plantas consecuentemente con la oviposición y el desarrollo de las larvas.

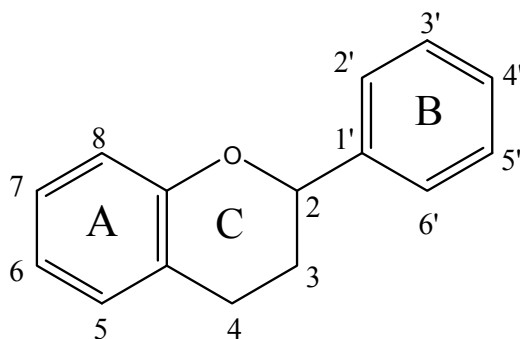
Como ya ha sido mencionado previamente, tanto el ácido gálico como su dímero, el ácido elágico, son componentes de los taninos hidrolizables, y éstos son precisamente compuestos de defensa inducidos en agallas vegetales.

### **3.2. Flavonoides y estilbenos**

#### **3.2.1. Flavonoides**

Los flavonoides son un grupo muy diverso de compuestos fenólicos, de los cuales se conocen más de 6.000 estructuras diferentes.

El esqueleto común a todos los integrantes del grupo consta de dos anillos de seis átomos de carbono (designados con las letras A y B) unidos mediante un puente de tres átomos de carbono que por lo común forma un tercer ciclo (anillo C) (Figura 15).



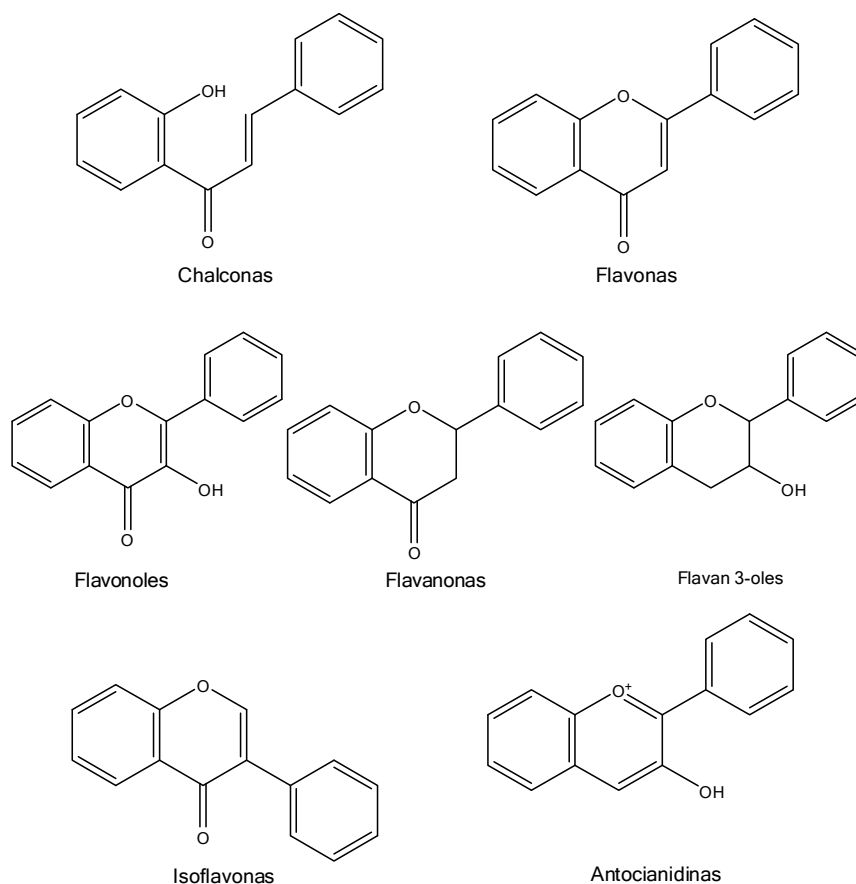
**Figura 15.** Estructura general de los compuestos flavonoides

Dependiendo del grado de oxidación del anillo central, se obtienen las diferentes estructuras de cada compuesto flavonoide en particular.

Dentro de las principales clases de flavonoides están comprendidos: chalconas, flavanonas, flavonas, flavonoles, isoflavonas, flavan-3-oles y antocianidinas. Asimismo los compuestos flavonoides incluyen a las unidades monoméricas de los denominados *taninos condensados*, las proantocianidinas o proantocianidoles. Las estructuras básicas correspondientes a cada uno de estos grupos se muestran en la Figura 16.

Los pigmentos flavonoides son responsables de gran parte de las coloraciones de las flores de Angiospermas, junto con los carotenoides (ver Capítulo 5).

A diferencia de los carotenoides, los flavonoides son compuestos que presentan afinidad con el agua, se acumulan en las vacuolas celulares y otorgan asimismo una mayor variedad de colores, comprendidos desde el rojo carmesí al azul y violeta, rosado, blanco y amarillo.



**Figura 16.** Estructuras químicas de las distintas clases de flavonoides

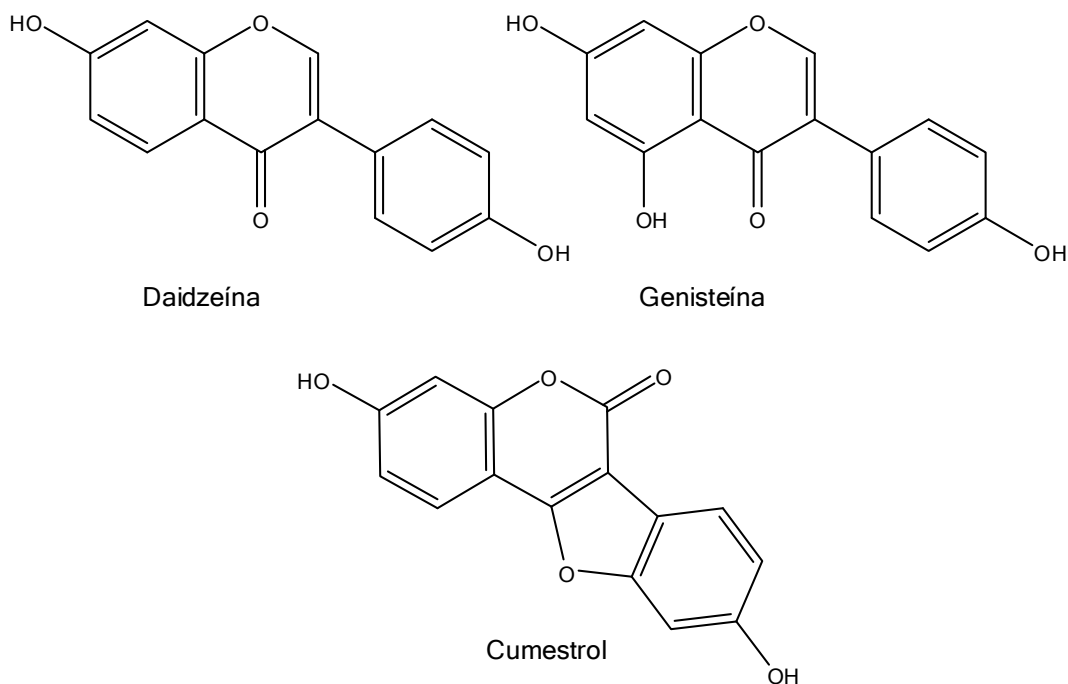
A continuación, se reseñan brevemente algunas características distintivas de cada grupo de flavonoides:

- Chalconas y flavanonas. En el caso de las chalconas, el puente de tres carbonos no forma la estructura cíclica mencionada anteriormente y que da lugar al anillo C.

Las flavanonas son isómeros de las chalconas pero puede observarse en su estructura la formación del anillo C. No existe el doble enlace entre los carbonos 2 y 3 de dicho anillo. Esta última característica las distingue de las flavonas, que sí presentan el enlace C=C dentro del anillo central.

- Isoflavonas. Las isoflavonas son isómeros de las flavonas, siendo la diferencia entre ambos grupos la posición del anillo B: mientras que en las flavonas se encuentra unido al C<sub>2</sub>, en las isoflavonas aparece en la posición C<sub>3</sub>. Se halló que las isoflavonas son casi exclusivas de la familia *Fabaceae* (Leguminosas), con altas concentraciones en especies como la soja (*Glycine max*).

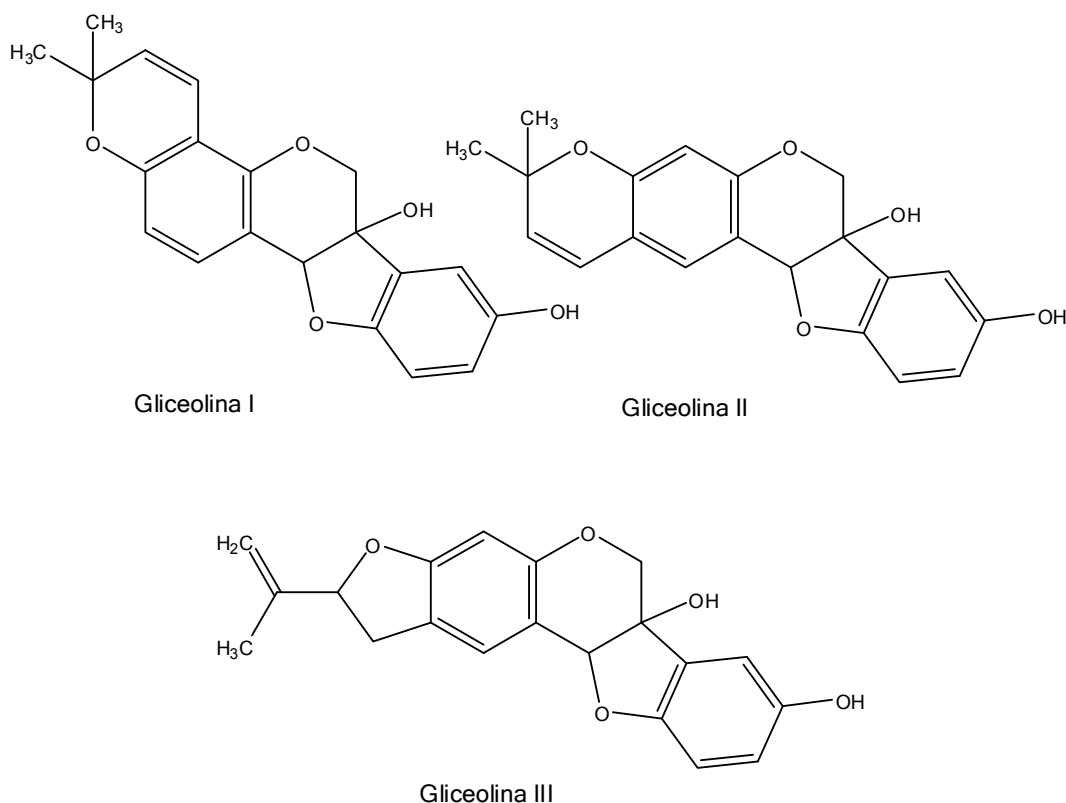
Comprenden un grupo de sustancias con fuerte actividad estrogénica. Son también abundantes en algunos cultivares de tréboles y alfalfa, habiéndose señalado como causantes de infertilidad en ganado ovino. La explicación reside en la similitud de su estructura con la de ciertas hormonas esteroideas (principalmente el estradiol, que anula la ovulación) que hace que las isoflavonas sean capaces de unirse a los receptores de los estrógenos. Las isoflavonas daidzeína, genisteína y el cumestrol (Figura 17) presentes en dichas especies vegetales tienen suficiente actividad estrogénica como para afectar en distinto grado la reproducción de animales en pastoreo. Han sido llamados *fitoestrógenos*.



**Figura 17.** Estructuras químicas de las isoflavonas daidzeína, genisteína y cumestrol

El cumestrol, además de la actividad señalada, es considerado una fitoalexina de la soja, un compuesto antimicrobiano de bajo peso molecular que es sintetizado *de novo* y se acumula en la planta luego de la exposición a microorganismos.

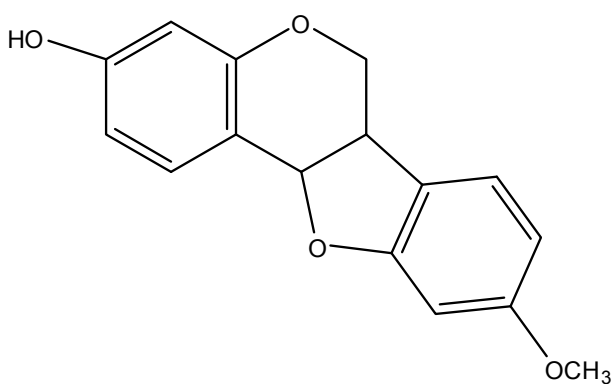
Gran parte de las investigaciones referidas a la defensa de la planta de soja se han enfocado en las fitoalexinas gliceolina I, II y III (Figura 18). Se ha llegado a demostrar que la gliceolina previene la acumulación de aflatoxina B1 en cultivos del hongo *Aspergillus flavus* (Boué *et al.*, 2000: 2167). Las concentraciones de este compuesto pueden incrementarse con la aplicación de ciertos herbicidas sobre la planta de soja. Investigaciones previas se han referido también a los mecanismos desencadenados en las plantas de soja como respuesta a la incidencia del hongo *Phytophthora megasperma* var. *sojae* (Boué *et al.*, 2000: 2168).



**Figura 18.** Estructuras químicas de las fitoalexinas de soja: gliceolinas I, II y III

La alfalfa cultivada (*Medicago sativa* L.) es el hospedante de diversos hongos patógenos. Varios trabajos de investigación indican que la acumulación de fitoalexinas del grupo de las isoflavonas, con acción antimicrobiana, constituye un factor importante de resistencia a dichos patógenos.

La medicarpina (Figura 19) presente en ciertos cultivares de alfalfa, un derivado de las isoflavonas perteneciente a la clase de los *pterocarpanos*, ha sido mencionado en este caso como una de las principales fitoalexinas en esta especie (Dalkin *et al.*, 1990: 440).



**Figura 19.** Estructura química de la medicarpina, una fitoalexina presente en alfalfa

- Flavonas y flavonoles. Los flavonoles se distinguen de las flavonas por presentar un grupo hidroxilo unido al C<sub>3</sub> en el anillo C.

Estudios fitoquímicos indican que la simple diferencia de estructuras entre flavonas y flavonoles es de considerable importancia filogenética, siendo las flavonas más frecuentes que los flavonoles en las flores de las familias botánicas más evolucionadas.

Las flavonas y flavonoles presentan coloración que puede variar entre amarillo pálido y blanco. En algunos casos se trata de compuestos incoloros.

En las flores actúan generalmente como co-pigmentos de las antocianinas. El fenómeno de copigmentación se interpreta como un mecanismo intermolecular entre las antocianinas y el co-pigmento, estableciéndose puentes de hidrógeno entre ambos.



Las flavonas y flavonoles están también muy difundidos en las hojas. Presentan absorción máxima en la región UV del espectro electromagnético. Como pigmentos protectores, impiden o reducen el daño que produce la radiación UV sobre las plantas.

Dado que las flavonas y flavonoles generalmente absorben radiación de menor longitud de onda que otras clases de flavonoides, como por ejemplo las antocianinas, en muchos casos no son visibles al ojo humano.

Sin embargo, insectos como las abejas cuya visión abarca parte del rango ultravioleta del espectro electromagnético pueden responder al estímulo de las flavonas y flavonoles como atrayentes.

Se ha comprobado que frecuentemente las flavonas y flavonoles se disponen en un patrón simétrico de cintas o líneas, puntos, manchas o círculos concéntricos llamado “guías del néctar”. Se piensa que las guías del néctar ayudan a indicar a los insectos la localización del néctar y del polen (Taiz y Zeiger, 1998: 365).

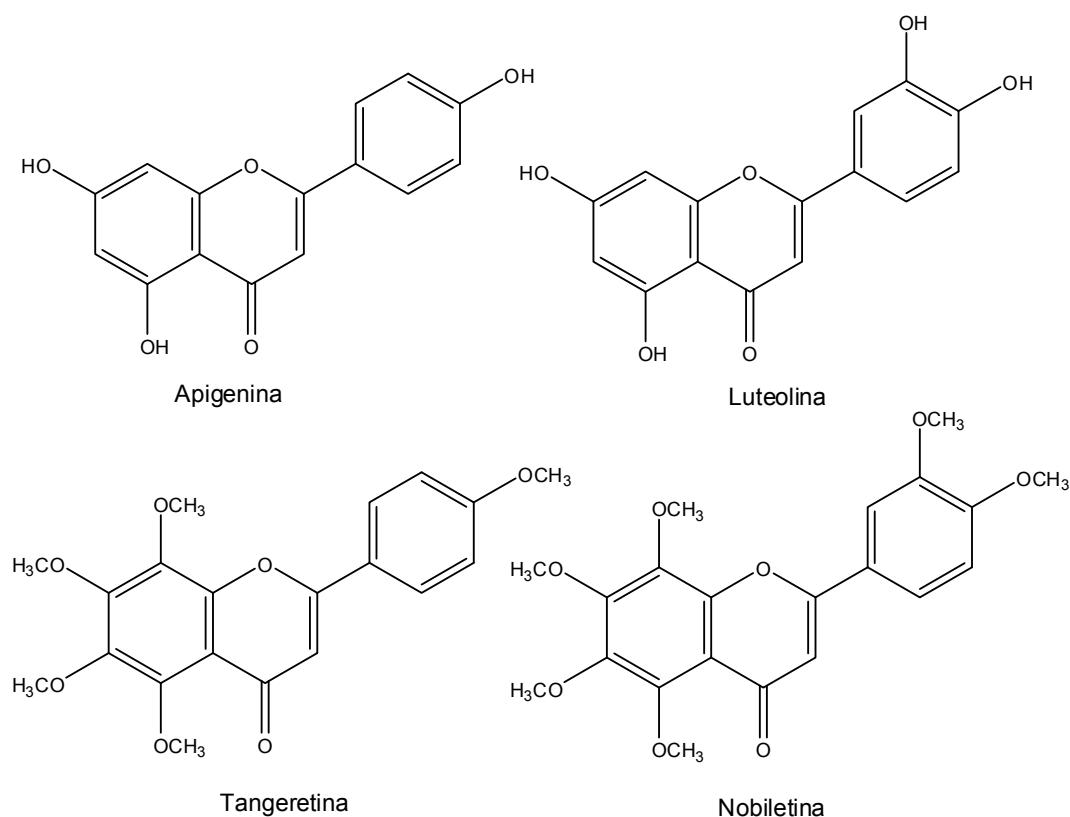
Como se ha indicado anteriormente, ciertas flavonas y flavonoles son emitidos como sustancias señal por raíces de Leguminosas (*Fabaceae*) a fin de inducir en bacterias del grupo de los rizobios la expresión de genes requeridos para la nodulación.

Entre los ejemplos correspondientes a flavonas pueden mencionarse a apigenina y luteolina, presentes en apio, perejil y otras plantas herbáceas y a tangeretina y nobiletina, compuestos polimetoxilados presentes en especies de *Citrus* (Figura 20).

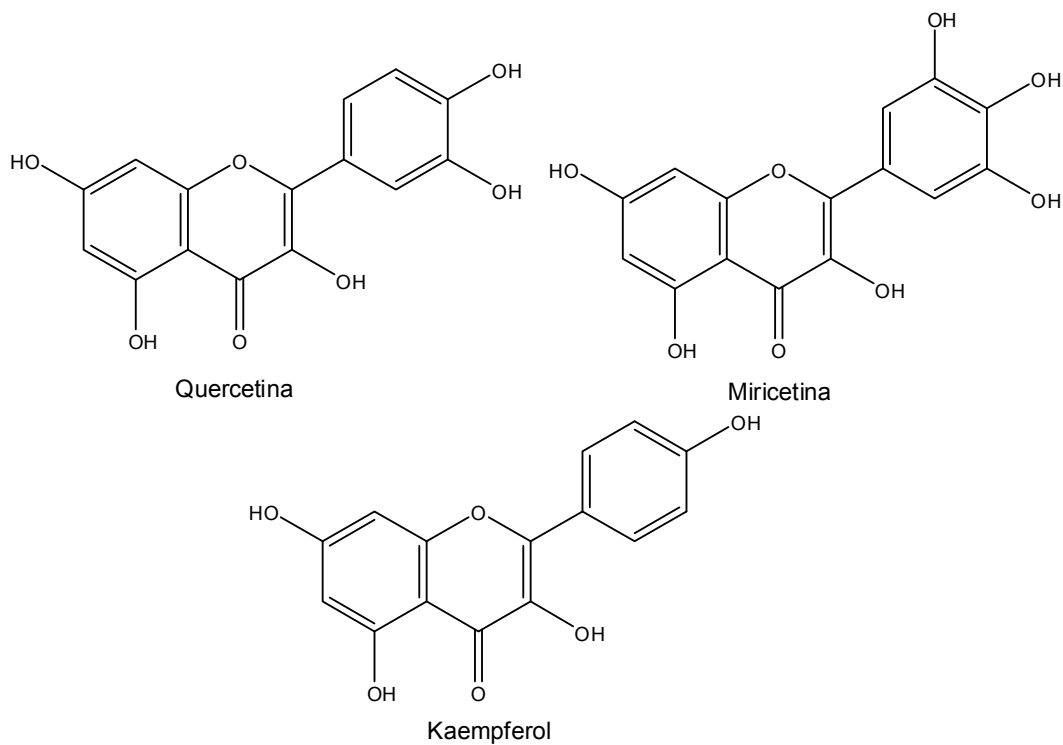
Dentro de los flavonoles se encuentran incluidos los compuestos quercetina, miricetina y kaempferol (Figura 21).

- Antocianinas. Las antocianinas representan dentro de los flavonoides el grupo responsable en mayor medida de un amplio rango de tonalidades, conjuntamente con otros flavonoides que se desempeñan como pigmentos accesorios. Las antocianinas son los componentes que otorgan la mayoría de las coloraciones rojas, azules, violetas y rosadas a flores, tallos, hojas, frutos, raíces y semillas.

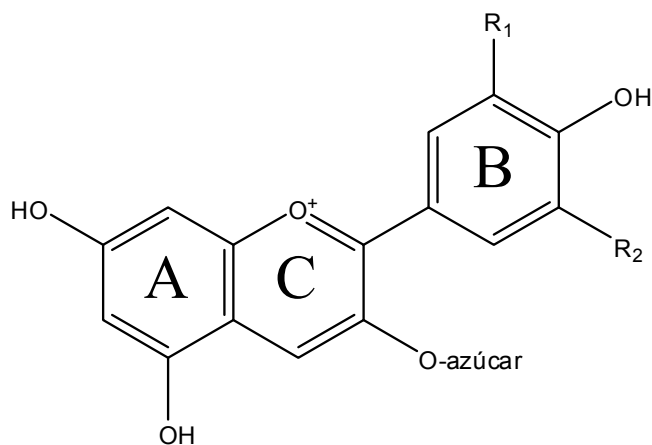
El carbono 4 en la estructura del anillo C no porta un átomo de oxígeno, por lo tanto se trata de derivados reducidos (Figuras 16 y 22). Poseen un átomo de oxígeno cuadrivalente y, como consecuencia de la carga positiva, las antocianinas son capaces de formar sales con ácidos; en las células pueden presentarse como cationes asociados con aniones de ácidos orgánicos. Se trata de glicósidos que presentan azúcares combinados generalmente en la posición 3 (Figura 22). El glicósido recibe el nombre de *antocianina* mientras que el aglicón, es decir la porción no glucídica de la molécula, es denominado *antocianidina*.



**Figura 20.** Estructura química de algunas flavonas



**Figura 21.** Estructura química de algunos flavonoles



**Figura 22.** Estructura química de los pigmentos antociánicos

La manifestación de la coloración de estos compuestos está influida por varios factores. En cuanto a la expresión del color asociada a las variaciones en la estructura química, el anillo B presenta diferentes alternativas en sus patrones

de sustitución. Pueden presentarse grupos funcionales hidroxilo y/o metoxilo reemplazando a los átomos de hidrógeno en diferentes posiciones (3', 4' y/o 5') y de esta forma se da origen a las distintas clases de pigmentos antociánicos.

Así, las pelargonidinas presentan colores anaranjado-rojizos; las cianidinas otorgan tintes rojos y magentas y las delphinidinas, púrpuras y azules (Tabla 1). La tendencia general indicaría que a un mayor número de sustituyentes –OH los colores tienden a ser más azulados.

Por otra parte, la incorporación de grupos metoxilo en las estructuras moleculares, como en el caso de la peonidina, petunidina y malvidina (Tabla 1), conduce al desarrollo de colores rojo brillante y rojo borgoña.

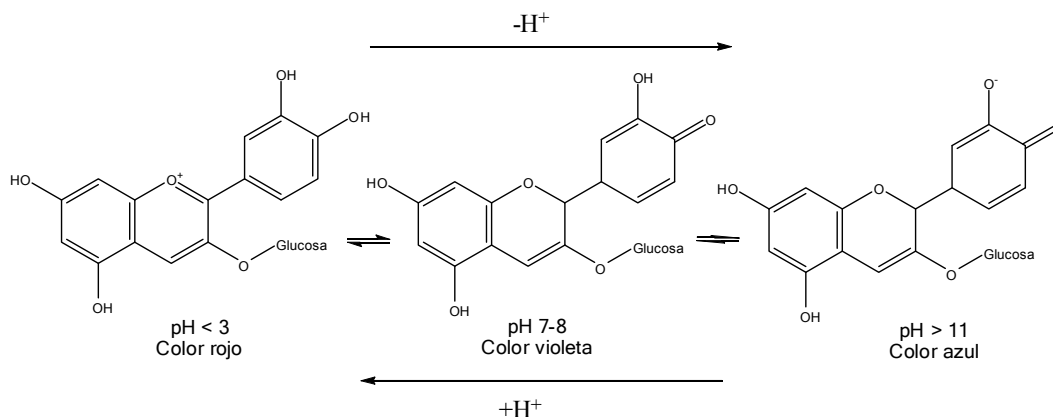
El pH del medio también ejerce marcada influencia en la coloración de los pigmentos antociánicos. Cuando el medio es alcalino, los grupos hidroxilo ceden sus protones y los electrones se encuentran más deslocalizados en la forma básica. Ello conduce a que el color vire progresivamente hacia el azul. Cuando el pH desciende, el color cambia al rojo (Figura 23).

La presencia de iones metálicos también tendrá incidencia en el color final de los compuestos antociánicos, generalmente otorgando al mismo un tinte más azulado. Los iones  $Mg^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  son mencionados al respecto. Los mismos participan formando complejos con las antocianinas e incluso con otros pigmentos flavonoides accesorios (co-pigmentos).

Antocianidina	Sustituyente $R_1$	Sustituyente $R_2$	Azúcar	Color
Pelargonidina	-H	-H	glucosa	rojo anaranjado
Cianidina	-OH	-H	glucosa	rojo
Delphinidina	-OH	-OH	glucosa	violeta azulado
Peonidina	-OCH <sub>3</sub>	-H	glucosa, rutinosa	rosado
Petunidina	-OCH <sub>3</sub>	-OH	glucosa	violeta
Malvidina	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	glucosa	violeta rojizo

**Tabla 1.** Ejemplos de antocianidinas indicando los sustituyentes en el anillo B (Figura 22) y el color característico. Adaptado de Bowsher et al. (2008) y Heldt (2005)

Se han señalado otros factores adicionales responsables de la expresión final del color de las antocianinas, entre ellos la concentración de las mismas en los distintos tejidos, el acompañamiento de flavonas y flavonoles como co-pigmentos, la presencia de carotenoides, etc.



**Figura 23.** Efecto del pH sobre la estructura química y el color de las antocianinas

### 3.2.2. Estilbenos

Se trata de un grupo de compuestos estrechamente relacionados con los flavonoides, por compartir precursores en común durante su proceso de biosíntesis e incluso por presentar ciertas propiedades similares (Bowsher *et al.*, 2008: 369).

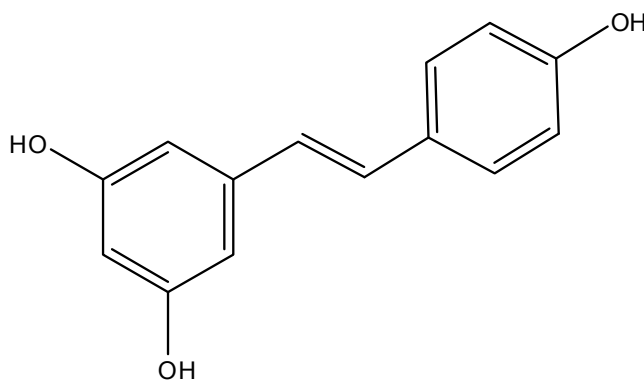
La estructura de los estilbenos está representada por dos anillos fenilo unidos entre sí mediante un puente de dos átomos de carbono (puente eteno). Se encuentran en un grupo relativamente pequeño de especies (pino, vid, maní, entre otras) y muestran una diversidad interesante de actividades biológicas. Particularmente, se los ha mencionado como sustancias con efectivas propiedades antifúngicas.

Se ha trabajado en la incorporación en plantas de tabaco y de alfalfa de los genes que codifican para la síntesis de la enzima estilbeno sintasa en las uvas. Las plantas modificadas fueron capaces de sintetizar estilbenos y mostraron

una mejor resistencia a hongos patógenos tales como *Botrytis cinerea* y *Phoma medicaginis*, respectivamente (Bowsher *et al.*, 2008: 365).

Dentro del grupo de los estilbenos se ubica al *resveratrol* (Figura 24), un compuesto que actúa como fitoalexina, hallado en concentraciones relativamente elevadas en las uvas y consiguientemente en vinos tintos (Bowsher *et al.*, 2008: 369).

La *viniferina* es otro ejemplo dentro de este grupo, sintetizada también por las plantas de vid (Heldt, 2005: 447).

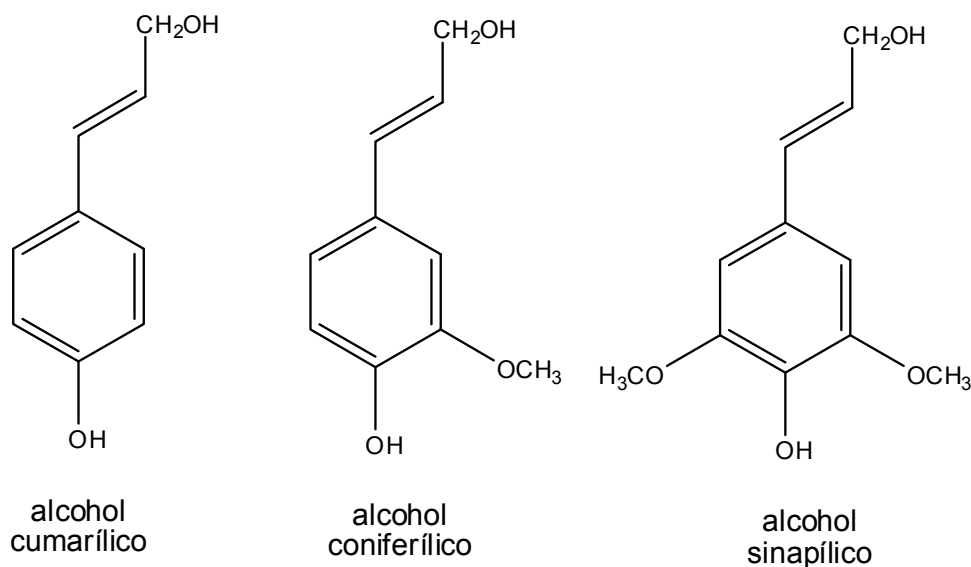


**Figura 24.** Estructura química del resveratrol, perteneciente al grupo de los estilbenos

### 3.3. Lignina

Se trata de un polímero complejo, heterogéneo, formado mayoritariamente por derivados fenilpropanoides que corresponden a los llamados *monolignoles*: los alcoholes *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico (Figura 25). La diferencia estructural entre estos compuestos radica en la cantidad y posición de los grupos metoxilo unidos al anillo fenilo. Las subunidades fenilpropanoides derivadas de los correspondientes alcoholes, tal como se incorporan al esqueleto de la macromolécula son las subunidades *p*-hidroxifenilo (H), guayacilo (G) y siringilo (S). Debido a las diversas estructuras de resonancia, se establecen muchas combinaciones posibles en el polímero complejo. La mayoría de los monolignoles reaccionan para formar uniones C-C o C-O-C,

construyendo un polímero altamente ramificado. Los grupos hidroxilo libres están presentes sólo en unas pocas cadenas laterales de la lignina y en ciertos casos resultan oxidados a funciones aldehído o carboxilo (Heldt, 2005: 443).



**Figura 25.** Estructura química de los monolignoles componentes de las ligninas

En la estructura compleja de la lignina pueden aparecer asimismo pequeñas cantidades de intermediarios de la biosíntesis de monolignoles, como así también algunos fenilpropanoides como *p*-cumaratos, ferulatos y *p*-hidroxibenzoatos (Bowsher *et al.*, 2008: 369).

La composición de las ligninas varía entre diferentes *taxa* e incluso puede diferir entre una célula y otra o entre diferentes sectores de la pared celular.

En plantas Dicotiledóneas prevalecen las subunidades derivadas de los alcoholes coniferílico y sinapílico (ligninas G y S, respectivamente). Las plantas Monocotiledóneas sintetizan lignina con predominio de subunidades derivadas del alcohol cumarílico (ligninas H).

En las Gimnospermas se observa mayoritariamente la ocurrencia de subunidades procedentes del alcohol coniferílico. Esta composición revela un mayor número de enlaces C-C que en la lignina de Angiospermas.

Aproximadamente una tercera parte de la madera seca está representada por lignina. La producción de celulosa y papel requiere que la lignina sea removida mediante procesos costosos y que implican riesgos de contaminación ambiental.

La madera de Gimnospermas, además de presentar distintas propiedades estructurales, requiere un tratamiento químico diferente al de la madera de Angiospermas cuando es destinada a la producción de papel. Los enlaces C-C adicionales que se presentan entre las subunidades G hacen de la lignina de Gimnospermas un material más resistente al ataque químico.

Se han aplicado técnicas de ingeniería genética a plantas de álamo a fin de que las mismas produzcan moléculas de lignina con mayor aptitud para la producción de pasta de celulosa, requiriendo menor intensidad en los tratamientos químicos aplicados. En el caso de especies Gimnospermas no se mencionan ejemplos de este tipo de manipulación (Bowsher *et al.*, 2008: 370).

La lignina se encuentra unida covalentemente a la celulosa en las paredes celulares vegetales. Además de proveer resistencia mecánica a los órganos vegetales tales como tallos o vástagos y otorgar estabilidad a los tejidos vasculares del xilema, la lignina cumple también una función defensiva en las plantas. Es capaz de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y son escasos los géneros de hongos y bacterias capaces de degradar la lignina. Por otra parte, es sabido que la lignina participa también en ciertos procesos de cicatrización de heridas en órganos vegetales.

### **3.4. Taninos**

Los taninos son una variedad de polifenoles vegetales usados en el proceso de curtiembre para convertir la piel de los animales en cuero y hacerla así resistente al agua, al calor y al ataque de los microorganismos.

Durante la curtiembre se lleva a cabo la unión entre las proteínas de la piel (principalmente colágeno) y los taninos, a través de enlaces covalentes que se

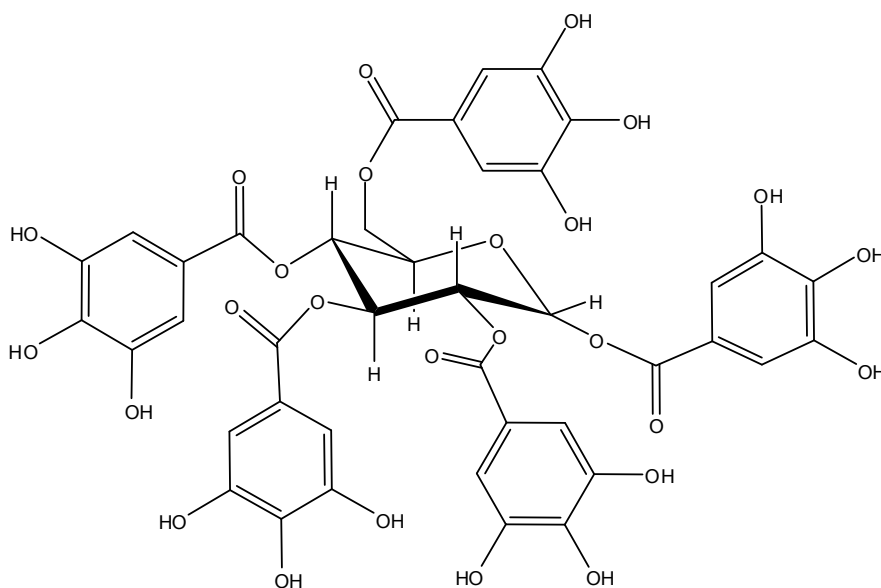


establecen entre los grupos  $\text{-NH}_2$  de las proteínas y los grupos  $\text{-OH}$  fenólicos. También se establecen enlaces no covalentes, mediante puentes de hidrógeno. Los taninos aparecen en altas concentraciones en la corteza y leño de algunos árboles y en agallas vegetales.

Debido a su actividad antioxidante, estos polímeros fenólicos interactúan con los sistemas biológicos. Sus aplicaciones en diversas industrias derivan en gran medida de su capacidad para formar complejos con alcaloides, iones metálicos (hierro, manganeso, vanadio, cobre, aluminio, entre otros) y con macromoléculas como las proteínas. Por su capacidad de precipitar alcaloides, pueden ser utilizados en caso de intoxicación con dichas sustancias (von Poser, 2007: 1).

Los taninos se agrupan en dos clases principales:

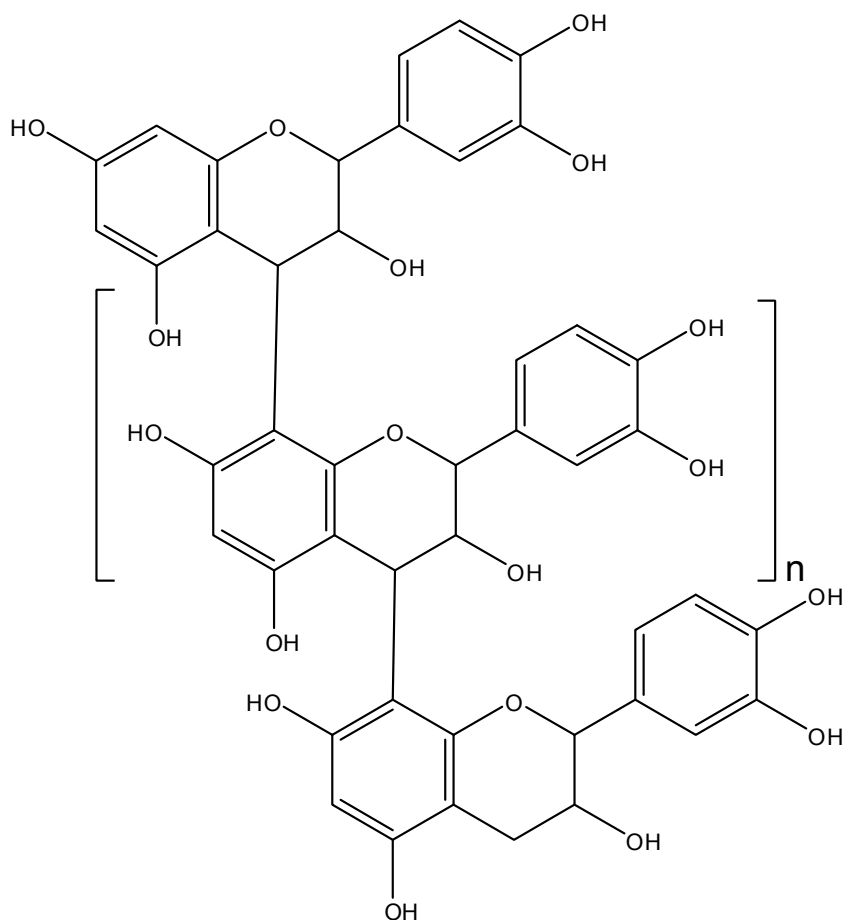
a) *Taninos hidrolizables*: se caracterizan por presentar estructura de glicósidos. La porción no glucídica (aglicón) corresponde a moléculas de ácido gálico o su dímero, el ácido elágico. Dentro de los azúcares, generalmente está presente la glucosa (Figura 26).



**Figura 26.** Estructura química de un ejemplo de taninos hidrolizables

b) *Taninos condensados*: se trata en este caso de polímeros cuyas estructuras están relacionadas con los compuestos flavonoides. Reciben también el

nombre de *proantocianidinas*, *proantocianidoles* o *leucoantocianidinas* (Figura 27).

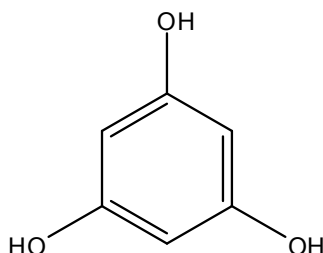


**Figura 27.** Estructura química de los taninos condensados

El término *proantocianidina* deriva de la reacción de oxidación que ocurre durante el calentamiento de estos polifenoles en soluciones alcohólicas ácidas, produciendo antocianinas, pigmentos de diferentes colores comprendidos entre el rojo y el violeta, a los que ya se ha hecho referencia con anterioridad. Las proantocianidinas contienen entre unas dos a cincuenta unidades de flavonoides.

Los taninos hidrolizables son más abundantes en Angiospermas Dicotiledóneas, en tanto que los taninos condensados son hallados tanto en Gimnospermas como Angiospermas.

Se menciona también un tercer grupo de taninos, de distribución mucho más restringida: el de los *florotaninos*, que consisten en polímeros de unidades de floroglucinol (Figura 28), obtenidos a partir de ciertas algas. Los mismos pueden encontrarse en concentraciones elevadas, de hasta un 15% del peso seco del material (von Poser, 2007: 1).



**Figura 28.** Estructura química del floroglucinol, unidad de los florotaninos

Los taninos tienen una masa molecular comprendida entre 500 y 3.000 Daltons. Independientemente de la clase a la que pertenezcan, se caracterizan por ser compuestos solubles en agua.

Como el resto de los compuestos fenólicos, los taninos son químicamente reactivos, capaces de formar puentes de hidrógeno intra e intermoleculares. Se trata de sustancias fácilmente oxidables, ya sea por acción de enzimas vegetales específicas o por efecto de metales (por ejemplo el ión férrico, bajo la forma de  $\text{FeCl}_3$ ), que produce el oscurecimiento de sus soluciones (Azeredo *et al.*, 2007: 20).

La actividad biológica de los taninos se correlaciona con su capacidad de unirse a las proteínas y combinarse con enzimas. Ha sido intensamente estudiada desde un punto de vista farmacológico la interacción de los taninos con enzimas que participan en procesos patológicos importantes.

Sus propiedades antimicrobianas también han sido ampliamente reconocidas y avalan algunos usos en medicina popular de plantas ricas en estos compuestos. Un ejemplo es la utilización de la especie *Maytenus ilicifolia* para el tratamiento de la úlcera, relacionada con la actividad antimicrobiana demostrada por los extractos de esta planta.

El crecimiento de diversos hongos, levaduras y bacterias resulta inhibido por los taninos. El mecanismo de acción se vincula con la capacidad de estas sustancias de inactivar a las enzimas, y a las proteínas en general, de los microorganismos. La infección de células vegetales se inicia frecuentemente con la secreción de enzimas microbianas que causan la lisis de las paredes celulares de las plantas. Estas enzimas pueden ser inactivadas cuando los taninos se unen a ellas (Heldt, 2005: 453).

Las investigaciones dedicadas a la búsqueda de agentes antivirales también han revelado que los taninos resultarían útiles al respecto, especialmente los taninos hidrolizables, mostrando mayor actividad aquéllos de menor peso molecular (von Poser, 2007: 1).

Como ya ha sido referido, los taninos son responsables de las propiedades de astringencia de ciertos órganos vegetales, como ocurre en el caso de diversos frutos que aún no han alcanzado su madurez fisiológica. La astringencia se produce debido a la unión de los taninos, abundantes en dichos órganos, con las proteínas de las mucosas y de la saliva, perdiendo esta última sus propiedades lubricantes.

Las altas concentraciones de taninos que se acumulan en frutos inmaduros actúan como un mecanismo de disuasión para herbívoros y posibilitan en cierto grado que los frutos alcancen su madurez y que no sean consumidos antes, favoreciendo la propagación de las semillas cuando éstas resultan viables y por ende, posibilitando la multiplicación natural de la especie.

Los taninos son responsables de una disminución de la digestibilidad de una planta, por establecerse la unión con las enzimas digestivas del animal que la consume.

Distintas variedades de sorgo (sorgos blancos, sorgos colorados) difieren en la concentración de taninos que se acumulan en los granos y esta diferencia se correlaciona con una diferente susceptibilidad al ataque de pájaros.

Un campo de creciente interés es el estudio de los efectos del consumo de plantas que contienen taninos en el ganado.

En ciertos casos se ha informado que los taninos pueden reducir el parasitismo intestinal. Los taninos condensados han mostrado efectos positivos sobre

ciertos rumiantes, referidos al aumento de crecimiento, de la eficiencia reproductiva, de la producción de lana en ovejas y de leche en bovinos.

Sin embargo, cuando estas sustancias se presentan en concentraciones elevadas, tienen influencia negativa en la ingestión voluntaria de alimentos y en la asimilación.

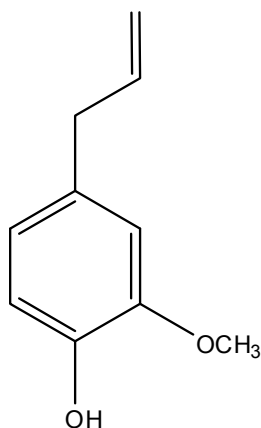
Los taninos son considerados factores antinutricionales por formar complejos con diversos tipos de moléculas, incluyendo no sólo proteínas (entre ellas las enzimas digestivas) sino también carbohidratos, vitaminas y minerales. Es importante el efecto mostrado por los taninos secuestrando el hierro de la dieta y sus consecuencias detrimentales desde el punto de vista nutricional.

### **3.5. Otras clases de compuestos fenólicos y sustancias relacionadas a los mismos**

#### **3.5.1. Fenilpropenos**

Son un grupo particular de compuestos fenólicos, importantes por su contribución a ciertos sabores y aromas característicos de determinadas plantas. Los frutos de las *Apiaceae* (*Umbelliferae*) son especialmente ricos en fenilpropenos. Son aislados normalmente de los tejidos en la fracción correspondiente a los “aceites esenciales” (Capítulo 5), junto con ciertos terpenoides volátiles. Ejemplos particulares de compuestos clasificados dentro de este grupo han sido mencionados previamente en este mismo Capítulo: eugenol (Figura 29), cinamaldehído, miristicina, entre otros.

A diferencia de la mayoría de los compuestos fenólicos, los fenilpropenos son sustancias liposolubles.



**Figura 29.** Estructura química del compuesto eugenol

### 3.5.2. Lignanos

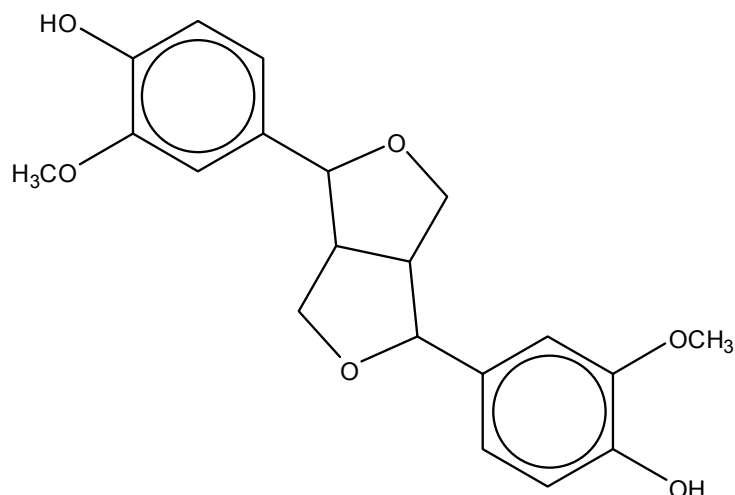
La dimerización de monolignoles conduce a la formación de *lignanos* y puede producirse a través de sus cadenas laterales o en ciertos casos por la condensación de los dos anillos fenólicos. Los lignanos vegetales se presentan también como oligómeros.

Estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal como sustancias de defensa.

El lignano *pinorresinol* (Figura 30) es un constituyente de la resina de *Forsythia spp* y se forma cuando se produce una herida en la planta. Actúa como inhibidor de ciertas enzimas microbianas. Otro lignano, el *malognol*, inhibe también el crecimiento de bacterias y hongos.

Ciertos lignanos presentan propiedades farmacológicas interesantes, como es el caso de la *podofilotoxina*, obtenida a partir del género *Podophyllum*, perteneciente a la familia *Berberidaceae*. Se trata de una toxina mitótica, que se ha evaluado como droga para combatir el cáncer (Heldt, 2005: 442).

La *arctigenina* y la *traqueologina*, procedentes de plantas trepadoras tropicales, se destacan por sus propiedades antivirales.



**Figura 30.** Estructura química del compuesto pinorresinol

### 3.5.3. Cutina y suberina

Los órganos vegetales que se hallan expuestos a la atmósfera se encuentran recubiertos por capas de materiales lipídicos que reducen la pérdida de agua y ayudan a bloquear la entrada de bacterias y hongos patógenos. Dentro de estos compuestos están incluidas ceras, cutina y suberina.

Las ceras, en su mayoría, se componen de ésteres de ácidos grasos de cadena larga (entre 20 y 24 átomos de carbono) y alcoholes de alto peso molecular ( $C_{24}$ - $C_{32}$ ), constituyendo una de las clases de lípidos comprendidas dentro de los *lípidos simples*, junto con los triacilglicerolos. En la composición de las ceras pueden presentarse también alcanos de cadena lineal, alcoholes y ácidos grasos libres, aldehídos de cadena larga, cetonas, etc.

La cutina y la suberina en particular presentan en su composición, además de ciertos ácidos grasos con características peculiares, una porción de la molécula que reviste naturaleza fenólica.

La cutina se distribuye principalmente como recubrimiento de los órganos aéreos, mientras que la suberina es propia de los órganos subterráneos de las

plantas, los tallos leñosos y las heridas en proceso de cicatrización. Ambos compuestos se encuentran frecuentemente asociados con ceras.

La cutina es una macromolécula, un polímero formado por una alta proporción de ácidos grasos de elevado peso molecular que se encuentran unidos entre sí a través de uniones éster, dando lugar a una estructura en red tridimensional, rígida.

Los ácidos grasos que la constituyen tienen generalmente 16 ó 18 átomos de carbono, saturados o insaturados. Se distinguen por la presencia de funciones hidroxilo o grupos epóxido, que se ubican en la parte media de la cadena o en el extremo opuesto al grupo carboxilo principal.

La *cutícula* que recubre las paredes celulares externas de las células de la epidermis vegetal está formada principalmente por cutina, sustancia que le otorga a esta estructura sus típicas propiedades de impermeabilidad al agua y a los gases. Es propia de plantas herbáceas.

La cutícula se describe como una secreción formada por múltiples mantos o estratos, compuesta exteriormente por una capa de ceras, una capa intermedia, gruesa, formada por cutina embebida en ceras (que correspondería a la cutícula propiamente dicha) y un estrato más interno formado por cutina y ceras mezcladas con las sustancias pécticas de la pared celular, celulosa y otros carbohidratos estructurales.

La estructura polimérica de la suberina no ha sido completamente dilucidada, pero se sabe que también se encuentra formada por ácidos grasos que portan grupos hidroxilo y epoxi combinados mediante enlaces éster. La principal diferencia observada con respecto a la cutina es la presencia de ácidos grasos dicarboxílicos y una mayor proporción de componentes de cadena larga y de compuestos fenólicos como parte de la estructura (Taiz y Zeiger, 1998: 349).

Según Heldt (2005: 444), se trata de un polímero compuesto por unidades fenilpropanoides, ácidos grasos de cadena larga ( $C_{18}$ - $C_{30}$ ), hidroxiácidos grasos y ácidos dicarboxílicos ( $C_{14}$ - $C_{20}$ ). Los componentes fenilpropanoides se encuentran parcialmente unidos entre sí de manera similar a lo observado en la lignina. Ciertos grupos hidroxilo no participan en estas uniones y forman en cambio ésteres con ácidos grasos.



La suberina es un constituyente importante de las paredes celulares más externas de los órganos vegetales subterráneos.

Se asocia también a las células del súber de la *peridermis*, tejido constituyente de la corteza exterior de tallos y raíces que experimentan crecimiento secundario, en las plantas leñosas.

Al respecto, en los tallos de especies que manifiestan crecimiento secundario intenso la epidermis es reemplazada por la peridermis, otro tejido de protección derivado de la actividad de un meristemo secundario llamado *felógeno*. El mismo sufre divisiones periclinales dando lugar a células que se diferencian hacia el exterior como *súber* o *corcho* y hacia el interior como *felodermis* o *córtex secundario* (Cortés Benavides, 1986: 120). Cuando alcanzan la madurez, las paredes de las células del súber o corcho se suberifican y se produce la muerte de los protoplastos.

Las capas de súber protegen a las plantas contra la pérdida de agua, la infección de microorganismos y la exposición al calor. Por este motivo, algunas plantas son capaces de sobrevivir a la ocurrencia de incendios breves pudiendo continuar su crecimiento al extinguirse los mismos.

Al describir la estructura interna de la raíz se menciona a la *endodermis*, como la capa más interna del córtex, formada por una sola hilera de células. Las paredes de las células de la endodermis son inicialmente delgadas, a excepción de un engrosamiento en forma continua que se observa en las paredes radiales y transversales (Fahn, 1982: 22). La estructura recibe la denominación de *banda de Caspary*. Su función principal reside en impedir la difusión del agua a través de las paredes celulares y lograr que las soluciones atraviesen el protoplasma de las células endodérmicas. La naturaleza impermeable de la banda de Caspary se debe a la presencia de suberina, que actúa como una barrera de difusión entre el apoplasto del córtex de la raíz y el cilindro central. Al producirse la plasmólisis celular, se observa que el protoplasto se separa de las paredes tangenciales, pero permanece solidario en su extensión a la banda de Caspary.

En muchas plantas las paredes de las células de las capas más externas del córtex de la raíz, situadas por debajo de la epidermis, también se suberizan.

Ello hace que se diferencie una *exodermis*, con funciones de protección. Dicha estructura presenta similitud en cuanto a organización y composición citoquímica con la endodermis. Puede observarse una laminilla de suberina prácticamente continua que recubre internamente a la pared celular primaria, y en muchos casos se observa también deposición de lignina.

En las hojas de Monocotiledóneas, especialmente en Gramíneas (*Poaceae*), las vainas parenquimáticas que rodean a los haces menores se distinguen en vainas de una y de dos capas. Las células de la vaina más interna, el *mestoma*, son de menor diámetro en sección transversal, pero sus paredes son más gruesas y contienen láminas de suberina atravesadas por plasmodesmos (Fahn, 1982: 263). El mestoma guarda por tal motivo cierta analogía con la endodermis de la raíz. Se han observado capas de suberina en las paredes de la vaina parenquimática del maíz y de otras plantas C4.

La suberina aparece también en las zonas de abscisión foliar y en superficies afectadas por lesiones y/o enfermedades.

A modo de resumen, la Tabla 2 muestra una clasificación de los principales grupos de compuestos fenólicos. No se han incluido ciertas clases que, por motivos de extensión, no han sido desarrolladas en el presente texto. Entre las mismas se encuentran: a) ciertos fenoles simples con estructura  $C_6$  incluyendo compuestos como hidroquinona y catecol; b) acetofenonas y fenilacetatos ( $C_6-C_2$ ); c) xantonas ( $C_6-C_1-C_6$ ); d) antraquinonas ( $C_6-C_2-C_6$ ); e) biflavonoides ( $C_6-C_3-C_6$ )<sub>2</sub> presentes en Gimnospermas.

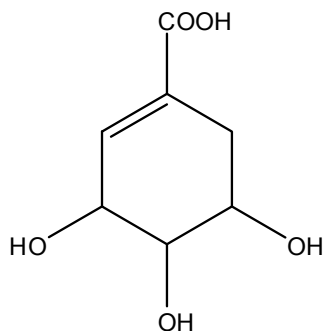
#### 4. Origen biosintético de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos, dependiendo del grupo en cuestión, se originan a partir de las siguientes vías metabólicas secundarias:

- a) Directamente a partir del *ácido shikímico* (Figura 31), que es considerado el precursor común de todo el grupo.

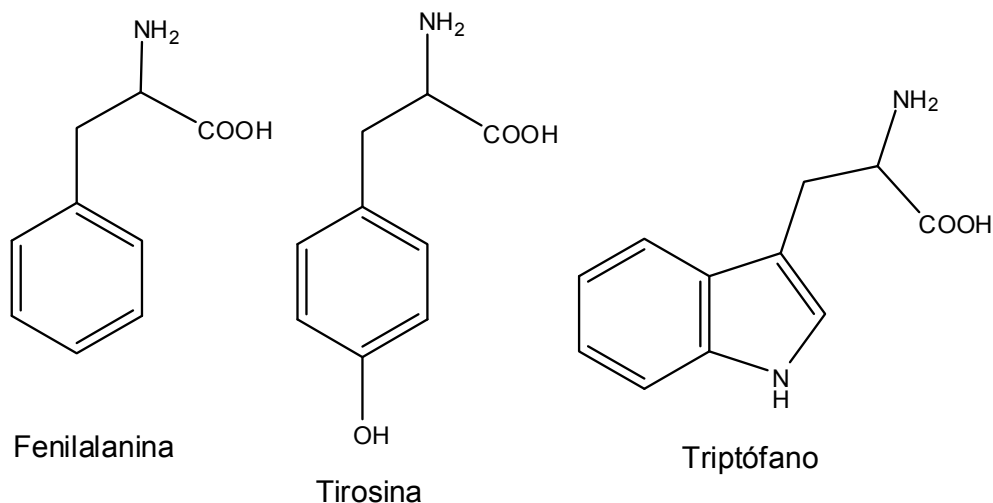
N° de carbonos	Esqueleto	Clasificación	Ejemplos de compuestos	Ejemplo de ocurrencia
7	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Ácidos fenólicos (hidroxibenzoatos)	Ácido gálico	Componente de taninos hidrolizables presentes en agallas vegetales
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Ácidos hidroxicinámicos (hidroxicinamatos)	Ácido cafeico (anión cafeato)	Clorogenatos en <i>Solanaceae</i>
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Fenilpropenos	Eugenol	En aceites esenciales de varias familias botánicas
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Cumarinas e hidroxicumarinas	Cumarina, umbeliferona, esculetina	Cumarina en <i>Melilotus alba</i> ; hidroxicumarinas en miembros de las familias <i>Rutaceae</i> , <i>Solanaceae</i> y <i>Apiaceae</i>
10	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naftoquinonas	Juglona	Presente como un glucósido en <i>Juglandaceae</i>
14	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Estilbenos	Resveratrol	Uvas
15	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoides	Quercetina	Bajo la forma del glucósido rutina en varias familias botánicas
18	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lignan	Pinorresinol	En árboles de <i>Picea</i> y <i>Pinus</i>
n	(C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> ) <sub>n</sub> :Glucosa	Taninos hidrolizables	Galotaninos	Taninos en agallas de <i>Rhus semialata</i>
n	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Taninos condensados	Polímeros de catequiza	Taninos en la corteza de <i>Quercus robur</i>
n	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Ligninas	Ligninas formadas por unidades guayacilo y guayacilo-siringilo	Ligninas en Gimnospermas y en Angiospermas, respectivamente

**Tabla 2.** Clases principales de compuestos fenólicos en especies vegetales. Adaptado de Strack (1997) y Bowsher et al. (2008)



**Figura 31.** Estructura química del ácido shikímico

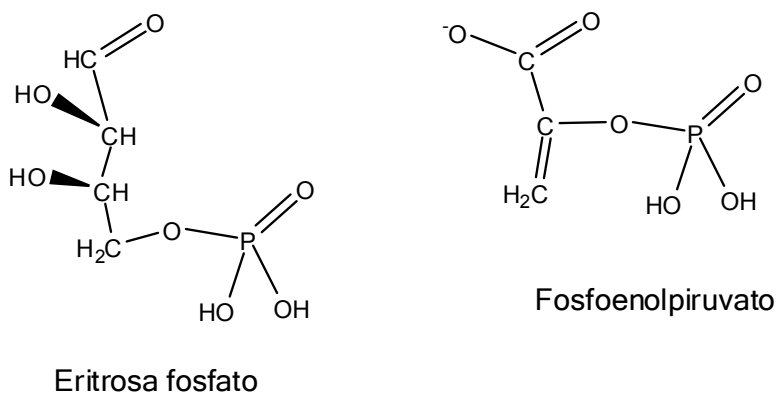
- b) A partir de los aminoácidos aromáticos, que derivan a su vez del ácido shikímico. Los aminoácidos aromáticos son fenilalanina, tirosina y triptófano (Figura 32). La fenilalanina en particular (y en algunos casos la tirosina) actúa como precursor de algunos grupos de compuestos fenólicos. Es denominada *vía fenilpropanoide*.
- c) A partir de una vía combinada, donde participan *compuestos fenilpropanoides* por un lado y por otro el *malonato* (anión del ácido malónico), bajo la forma de *malonilCoA* (malonil coenzima A). Esta es la denominada *vía fenilpropanoide-malonato*. Recordemos que el malonilCoA deriva a su vez del acetilCoA.



**Figura 32.** Estructura química de los aminoácidos aromáticos

#### 4.1. Biosíntesis del ácido shikímico y de los aminoácidos aromáticos

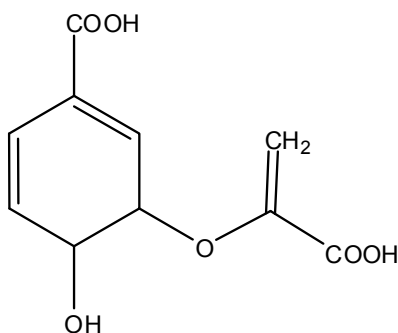
Los sustratos iniciales para la síntesis de ácido shikímico provienen de las vías de degradación de glúcidos. Los compuestos de partida son la eritrosa fosfato (4C), proveniente de la ruta oxidativa de las pentosas fosfato, y el fosfoenolpiruvato (3C), compuesto intermediario de la glucólisis (Figura 33).



**Figura 33.** Estructura química de los compuestos precursores del ácido shikímico

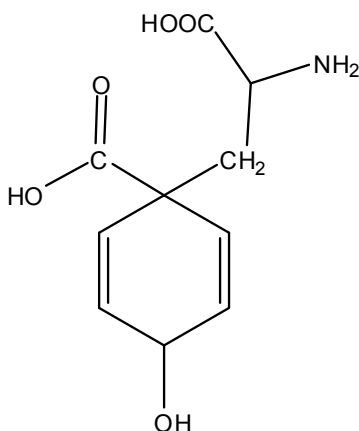
A través de intermediarios de siete carbonos y con aporte de electrones mediado por la participación de la coenzima de óxido-reducción nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), se sintetiza el ácido shikímico. Este compuesto fue aislado por primera vez en 1885 de los frutos de *Illicium religiosum* y su nombre deriva de esta planta oriental que es conocida como *shikimi-no-ki* en idioma japonés (Jiang y Singh, 1998: 4697).

Seguidamente, tras la ruptura de una molécula de adenosina trifosfato (ATP) y la incorporación de una segunda molécula de fosfoenolpiruvato catalizada por la enzima EPSP sintasa (sintasa del ácido 5-enolpiruvilshikímico 3-fosfato), se llega finalmente a obtener el intermediario llamado *ácido corísmico* (Figura 34). Este compuesto representa un punto de ramificación en la ruta que conduce a la síntesis de los distintos aminoácidos aromáticos. Uno de los caminos lleva a la formación de triptófano, mientras que otro deriva hacia la formación de fenilalanina y tirosina.



**Figura 34.** Estructura química del ácido corísmico

En este último caso y a partir del ácido corísmico, luego de varias reacciones químicas que incluyen la transferencia de un grupo amino, se llega al metabolito precursor de la fenilalanina y la tirosina, el *ácido arogénico* (Figura 35).

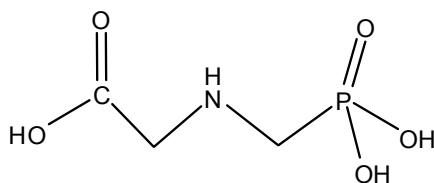


**Figura 35.** Estructura química del ácido arogénico

El herbicida de amplio espectro *glifosato* (Figura 36) produce la muerte de las plantas bloqueando uno de los pasos de esta ruta biosintética, aquél en el que participa la enzima EPSP sintasa. Actúa como un inhibidor competitivo de la EPSP sintasa en relación a uno de sus sustratos, el fosfoenolpiruvato; y como un inhibidor no competitivo con respecto al co-sustrato ácido shikímico 3-fosfato.

El glifosato es altamente específico y no afecta a otras enzimas dependientes del fosfoenolpiruvato (Bowsher *et al.*, 2008: 373).

Ciertos materiales genéticos han sido desarrollados como cultivos resistentes al glifosato, a partir de la introducción de genes de una cepa de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (CP4) que codifica la síntesis de una enzima EPSP sintasa insensible al glifosato. Como ejemplos pueden mencionarse ciertos cultivares de algodón, soja y colza.



**Figura 36.** Estructura química del herbicida glifosato

La ruta del ácido shikímico es propia de bacterias, hongos y plantas pero no se lleva a cabo en animales superiores.

Los aminoácidos fenilalanina y triptófano son considerados aminoácidos esenciales y deben ser incorporados en la dieta de los vertebrados, incluyendo el hombre. La tirosina resulta esencial en animales jóvenes en crecimiento pero no en los adultos (Nelson y Cox, 2009: 686), los que pueden en principio sintetizarla siempre y cuando haya disponibilidad de fenilalanina a través de la dieta.

La vía del ácido shikímico, incluyendo los pasos finales que conducen a la síntesis de fenilalanina y tirosina, tiene lugar mayoritariamente en los plástidos (Bowsher *et al.*, 2008: 371).

#### 4.2. Reacciones iniciales de la vía fenilpropanoide

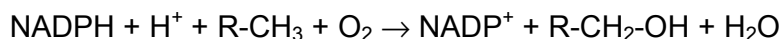
A partir de la fenilalanina se originan diversos compuestos fenilpropanoides, entre ellos el ácido cinámico que da origen a los fenoles simples y a otras sustancias derivadas.

La primera reacción que se lleva a cabo es una desaminación (se libera  $\text{NH}_3$ ) y a partir de la fenilalanina se obtiene el *ácido trans-cinámico* (C6-C3) (Figura 9). Esta reacción es catalizada por la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), quizás la enzima más estudiada del metabolismo secundario vegetal. La estructura de esta enzima corresponde a un tetrámero compuesto por subunidades de 75 a 83 kDa.

En algunas Gramíneas, la tirosina se convierte en ácido 4-hidroxicinámico mediante un mecanismo análogo, catalizado por la enzima tirosina amonio liasa. El amoníaco liberado es probablemente reutilizado por acción de la enzima glutamina sintetasa (Heldt, 2005: 437).

Estudios realizados en varias especies vegetales han mostrado que la actividad PAL se incrementa debido a factores tales como bajos niveles de nutrientes e incidencia de hongos, entre otros. Por ejemplo, la formación de fitoalexinas fenilpropanoides luego de una infección fúngica responde a una inducción de la actividad PAL.

El producto de la actividad PAL, el *ácido trans-cinámico*, es convertido en *ácido p-cumárico* por adición de un grupo  $-\text{OH}$  en posición *para* en el anillo aromático (Figura 9). La enzima que participa, la cinamato 4 hidroxilasa (C4H), es una monooxigenasa que utiliza al citocromo  $\text{P}_{450}$  como sitio de unión del  $\text{O}_2$ . Se caracteriza por la presencia de un grupo hemo que absorbe luz a 450 nm de longitud de onda. Aunque en la reacción participa el oxígeno molecular, sólo se transfiere un átomo de O al sustrato (el *ácido trans-cinámico*), de ahí que reciba la denominación de *monooxigenasa*. La reacción global puede representarse de la siguiente manera:



Reacciones subsiguientes en la vía fenilpropanoide conducen a la adición de otros grupos  $-\text{OH}$  y de sustituyentes metoxilo ( $-\text{OCH}_3$ ), dando origen a los *ácidos ferúlico y sinápico* (Figura 9), que forman el grupo de los ácidos hidroxicinámicos.



Como ya ha sido señalado, el ácido *trans*-cinámico y los ácidos hidroxycinámicos son compuestos fenólicos simples, llamados fenilpropanoides, que dan a su vez origen a muchos otros compuestos fenólicos.

Por ejemplo, a partir del ácido *p*-cumárico por hidroxilación y formación de un éster intramolecular (lactona) se origina la 7-hidroxycumarina o umbeliferona (Figura 11). La introducción de dos átomos de carbono en la molécula de umbeliferona produce el compuesto psoraleno (Figura 12), que ya ha sido mencionado también como ejemplo de furanocumarinas.

Ha sido descrito que ciertos derivados del ácido benzoico, incluyendo al ácido salicílico (Figura 7) se forman por ruptura de un fragmento de dos carbonos a partir de compuestos fenilpropanoides (Heldt, 2005: 439). Sin embargo, persiste cierta discrepancia en cuanto las rutas biosintéticas que conducen a los compuestos formados a partir del ácido benzoico, entre ellos los ácidos gálico y elágico que constituyen las unidades estructurales de los taninos hidrolizables, los cuales podrían originarse directamente del ácido corísmico, en lugar de la vía fenilpropanoide (Bowshe *et al.*, 2008: 370).

Uno de los pasos principales dentro de la vía fenilpropanoide es la formación de *p*-cumarilCoA a partir del ácido *p*-cumárico. La enzima participante es la 4-cumarato:CoA ligasa (4-CL). Esta enzima también reacciona con los ácidos cafeico, ferúlico y sinápico, para formar los ésteres respectivos con la Coenzima A. Se corresponde con un punto de ramificación importante en esta vía biosintética, entre las rutas que darán origen a los flavonoides y las que generarán los monómeros de las ligninas.

#### 4.3. Biosíntesis de lignina

Los componentes básicos para la síntesis de lignina son los alcoholes cumarílico, coniferílico y sinapílico (Figura 25), que como ya se ha mencionado son colectivamente llamados monolignoles. La vía para la síntesis de lignina es actualmente sujeto de investigación y tema de debate. Restan aún por resolver determinados aspectos de la misma.

La síntesis de monolignoles requiere la reducción del grupo carboxilo (-COOH) de los ácidos correspondientes a alcohol (-OH). Es necesario previamente que el ácido se esterifique con la coenzima A, reacción que consume ATP.

En las sucesivas reducciones, el agente reductor que participa es el NADPH.

Las mismas tres enzimas que catalizan la conversión del ácido *p*-cumárico a alcohol cumarílico, catalizan también la formación de alcohol coniferílico y sinapílico a partir de los ácidos ferúlico y sinápico, respectivamente.

Según Heldt (2005: 441), los alcoholes coniferílico y sinapílico pueden ser también originados a partir del alcohol cumarílico mediante hidroxilación seguida de metilación.

La estructura de la lignina se forma por polimerización de una mezcla de los tres monolignoles indicados. La síntesis de este polímero fenólico tiene lugar externamente a la célula. Existen indicios de que los monolignoles son exportados de la célula bajo la forma de glucósidos que son luego hidrolizados mediante enzimas glucosidasas.

Se ha indicado también que las enzimas lacasa y peroxidasa participan en la combinación de los monolignoles.

La primera de estas enzimas es una monofenol oxidasa que oxida el grupo fenol a un radical y transfiere hidrógeno vía un ión  $\text{Cu}^{2+}$  (que actúa como un cofactor enzimático) al oxígeno molecular.

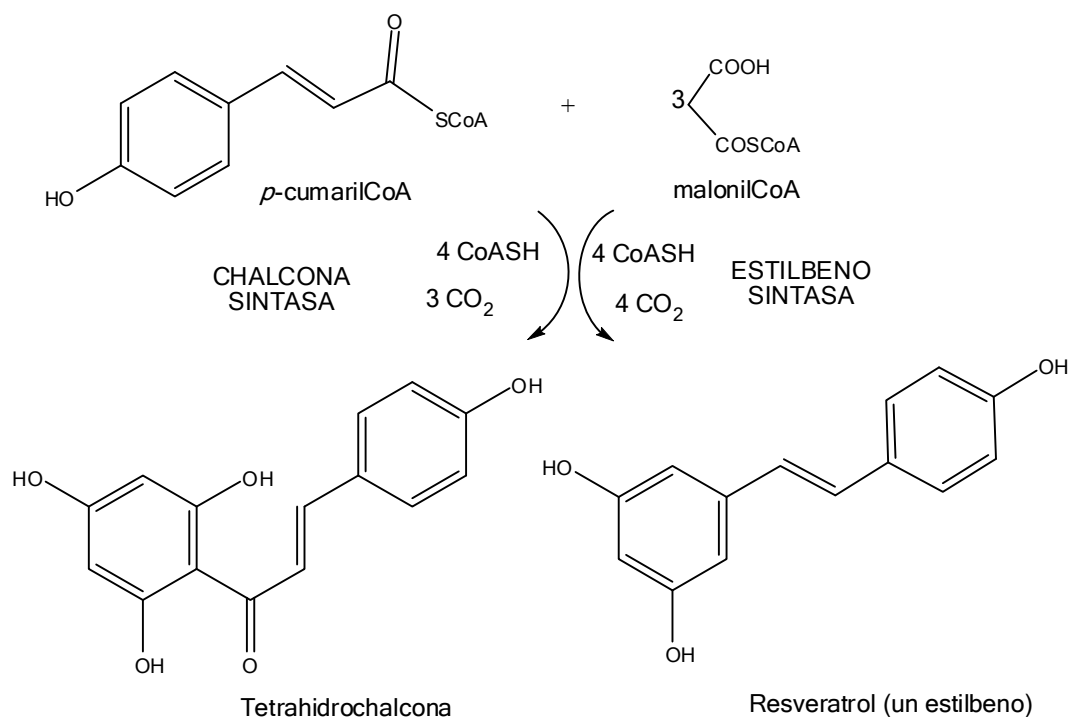
En el caso de las peroxidasas, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  actúa como agente oxidante. Los radicales fenólicos originados en este caso pueden dimerizar y finalmente polimerizarse a través de reacciones no catalizadas enzimáticamente.

Se ha postulado también que ciertas glicoproteínas extracelulares llamadas proteínas directrices o conductoras (*dirigent proteins*) son capaces de controlar la polimerización de los monolignoles (Heldt, 2005: 443).

#### **4.4. Vía fenilpropanoide-malonato**

Otra de las vías metabólicas que dan origen a parte de los compuestos fenólicos es la denominada vía fenilpropanoide-malonato. Las clases de

fenólicos originados a través de esta ruta son fundamentalmente los flavonoides y estilbenos (Figura 37).



**Figura 37.** Biosíntesis de flavonoides y estilbenos

En los compuestos flavonoides, como se ha mencionado previamente, un segundo anillo aromático se une a la porción fenilpropanoide de la molécula. Un precursor para la síntesis de flavonoides es la chalcona, sintetizada por la enzima chalcona sintasa (CHS) a partir de *p*-cumarilCoA y tres moléculas de malonilCoA. Esta reacción corresponde a la vía del malonato (Figura 37).

La liberación de tres moléculas de CO<sub>2</sub> y cuatro moléculas de Coenzima A hace que la síntesis de chalcona sea un proceso irreversible.

En la reacción general, el nuevo anillo aromático se forma a partir de tres residuos de acetato.

La estructura de la chalcona es convertida a flavanona por acción de la enzima chalcona isomerasa. La estructura cíclica se forma por la adición de un grupo

hidroxilo fenólico al doble enlace de la cadena carbonada que conecta los dos anillos. La flavanona es el compuesto precursor de los restantes flavonoides.

Por otra parte y tal como se indicó previamente, algunas especies vegetales presentan actividad estilbeno sintasa, mediante la cual la molécula de *p*-cumarilCoA reacciona también con tres moléculas de malonilCoA pero en este caso el carbono 9 de la cadena fenilpropanoide también se libera como CO<sub>2</sub> (Figura 37).

El estudio de las vías biosintéticas de los estilbenos es tema de interés por brindar nuevas posibilidades para combatir las infecciones fúngicas reduciendo el impacto del uso de agroquímicos.

## 5. Técnicas analíticas disponibles para el análisis de compuestos fenólicos relevantes desde el punto de vista de la alimentación animal

### 5.1. Cuantificación de ácido clorogénico

Como ya ha sido mencionado, las elevadas concentraciones de ácido clorogénico (Figura 10) en ciertos productos alimenticios pueden ser responsables de algunos problemas nutricionales observados.

La cuantificación de este compuesto puede llevarse a cabo a partir de la reacción con el ión titanio para formar un complejo coloreado cuya absorbancia es medida a 450 nm. La extracción se lleva a cabo con alcohol que luego es removido mediante evaporación al vacío. El residuo de la extracción se resuspende en acetona.

El reactivo de titanio se prepara disolviendo cloruro de titanio (TiCl<sub>4</sub>) en ácido clorhídrico (HCl) concentrado (37% p/v). Para la extracción, la muestra se trata a reflujo con etanol en agua (80%) ajustando el pH a 4,0. Una alícuota del extracto se seca al vacío a 50°C o mediante flujo de gas nitrógeno, retomando luego con acetona. Se adiciona seguidamente el reactivo de titanio y se procede a incubar a temperatura ambiente para leer la intensidad del color

desarrollado a 450 nm, comparando con el blanco. Se prepara una curva de calibración (0–200 µg/mL de ácido clorogénico) a fin de determinar el contenido de ácido clorogénico en la muestra problema (Makkar *et al.*, 2007: 89-91).

Esta técnica puede aplicarse también para cuantificar otros compuestos fenólicos, variando las longitudes de onda a la cual se leen los valores de absorbancia: los fenoles totales tienen su máximo de absorbancia a 410 nm y el catecol y la catequina a 430 nm (Makkar *et al.*, 2007: 89).

## 5.2. Gosipol

De acuerdo con su estructura química, el gosipol (Figura 30 Capítulo 5) es un aldehído polifenólico presente en las semillas de *Gossypium spp.* Sin embargo, por su origen biosintético es frecuentemente clasificado como un compuesto terpenoide (más específicamente un sesquiterpenoide), por tal motivo es mencionado también en el Capítulo 5 de esta obra. En esta sección se hará referencia a la determinación colorimétrica que permite su cuantificación en las semillas de algodón y sus productos derivados.

El gosipol resulta tóxico para los animales monogástricos, principalmente cerdos y conejos. Las aves muestran un mayor grado de tolerancia. La intoxicación con gosipol conlleva a constipación, disminución del apetito, pérdida de peso e incluso la muerte, causada por daño a nivel circulatorio.

Los métodos de análisis disponibles cuantifican gosipol libre y gosipol total, que incluye gosipol y derivados del gosipol, tanto libres como ligados.

Estas sustancias reaccionan con el compuesto 3-amino-1-propanol en una solución de dimetilformamida para formar un complejo diaminopropanol que reacciona a su vez con la anilina, obteniéndose dianilinosipol.

La técnica puede aplicarse a semillas de algodón, harinas, tortas y aceites crudos obtenidos de dichas semillas, no así a alimentos que contengan semillas enteras de algodón, no procesadas.

Los minerales, proteínas, aceites y polisacáridos presentes en la muestra pueden interferir y generar falsas respuestas positivas.

Los análogos del gosipol y sus derivados que presentan disponible una función aldehído también se cuantifican por este método.

El término gosipol libre y derivados del gosipol en subproductos de la semilla de algodón se aplica a compuestos solubles en mezclas acetona:agua al 70% bajo las condiciones del método. El gosipol y sus derivados reaccionan con tiourea y anilina en medio ácido, formando un complejo de color amarillo-anaranjado, cuya absorbancia se lee a 440 nm.

### **5.3. Cuantificación de taninos**

Como ya ha sido indicado, los taninos son polímeros fenólicos que característicamente presentan la capacidad de combinarse con las proteínas dando lugar a complejos tanino-proteína.

Desde el punto de vista de la alimentación animal, la ingestión de especies vegetales que contengan taninos afecta la utilización de nutrientes, en especial de las proteínas, reduciendo también el consumo de alimentos. Ciertas clases de taninos resultan potencialmente tóxicos, principalmente a nivel del hígado y los riñones llegando a causar, en situaciones extremas, la muerte de los animales.

Suelen clasificarse, como ya ha sido mencionado, en taninos hidrolizables y taninos condensados o proantocianidinas (Figuras 26 y 27).

Los procedimientos destinados a la cuantificación de taninos suelen dividirse en métodos químicos y en aquéllos basados en la precipitación de proteínas. Otros tipos de técnicas también disponibles corresponden a ensayos gravimétricos y bioensayos, entre otras.

Dentro de los métodos químicos, se encuentran los procedimientos para cuantificación de fenoles y taninos totales. Su fundamento es la ocurrencia de reacciones de óxido-reducción empleando reactivos como el de Folin-Ciocalteu o el de Folin-Denis, o la formación de complejos con metales, como el método que utiliza cloruro férrico.

El método de Folin-Ciocalteu es ampliamente usado para medir fenoles totales, a pesar de la interferencia que causan ciertos agentes reductores presentes en las muestras. Este método no permite distinguir entre taninos y fenoles que no pertenezcan a la clase de los taninos, a menos que se utilice una matriz sólida de polivinilpolipirrolidona (PVPP) asumiendo que los compuestos fenólicos capaces de unirse a proteínas también lo hacen a la PVPP (Makkar *et al.*, 2007: 70-79).

De esta forma, se procede a medir fenoles totales en extractos vegetales mediante el método de Folin-Ciocalteu, antes y después del tratamiento con PVPP. La diferencia entre ambos valores representa una medida del contenido de taninos.

Para taninos condensados pueden utilizarse los métodos que emplean vainillina por un lado, o butanol-HCl. El ensayo con butanol-HCl, con y sin adición de hierro, se fundamenta en la despolimerización oxidativa de los taninos.

El método de la vainillina ha sido aplicado a la medición de taninos condensados en sorgo, por ejemplo. Su especificidad es relativamente baja al igual que su reproducibilidad.

El método butanol-ácido, que es simple y más específico, produce antocianidinas de color rosado a partir de la ruptura oxidativa de los enlaces interflavanos de los taninos condensados, en presencia de ácidos minerales en solución alcohólica a 95°C. Se realizaron posteriormente algunas modificaciones sobre este método, incluyendo el agregado de hierro en el reactivo butanol-HCl con el objetivo de mejorar la sensibilidad y reproducibilidad del ensayo.

Los procedimientos fundamentados en la precipitación de proteínas suministran mayor información sobre el valor biológico de forrajes y piensos que contengan taninos.

En estos casos, se procede a la formación de los complejos tanino-proteína y el contenido de proteína de los mismos se mide empleando el método de la ninhidrina para los aminoácidos liberados mediante hidrólisis alcalina a partir

del complejo. Es posible de esta forma estimar la capacidad de precipitación de proteínas de una muestra que contenga taninos.

Otra alternativa es proceder a la formación de complejos tanino-proteína sobre papel cromatográfico empleando albúmina de suero bovino. La proteína ligada a los taninos se colorea con el colorante específico Ponceau S. Luego se eluye el colorante ligado a la proteína y se lee la absorbancia del eluato a 525 nm. Mediante una curva de calibración los valores de absorbancia se convierten a contenido de proteína.

Los métodos espectrofotométricos cuantifican taninos en relación a un estándar determinado que puede ser ácido tánico, ácido gálico, catequina, taninos del quebracho, leucoantocianidinas, etc.

El método gravimétrico basado en la precipitación de fenoles mediante acetato de iterbio mide fenoles totales y fenoles no-taninos.

Generalmente los métodos gravimétricos presentan menor sensibilidad que los métodos colorimétricos y demandan mayor tiempo.

Los procedimientos analíticos disponibles que implican la precipitación de proteínas por los taninos se llevan a cabo, en muchos casos, en condiciones distintas a las del rumen. Por tal motivo, los resultados obtenidos presentan aplicación limitada para predecir el valor nutritivo de alimentos que contengan esta clase de compuestos fenólicos.

Una alternativa para evaluar el efecto del contenido de taninos en muestras que serán suministradas a animales rumiantes, consiste en proceder a incubar la muestra problema junto con polietilenglicol 6000 (que inactiva a los taninos), aumentando de esta forma la producción de gas en un sistema *in vitro*. La solución tampón para la fermentación ruminal *in vitro* se prepara a partir de fluido recientemente recolectado del rumen de animales alimentados en forma controlada, que se mantiene a 39°C bajo un flujo de CO<sub>2</sub> hasta su uso. La composición del medio se prepara de acuerdo a lo señalado por Tilley y Terry (1963: 105). El porcentaje de incremento en la producción de gas durante un cierto tiempo de incubación se relaciona con el efecto de los taninos.

El contenido de taninos en leguminosas forrajeras también ha sido analizado mediante espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS).



## Notas

<sup>1</sup> Los glicósidos son compuestos orgánicos formados por un azúcar simple (comúnmente un monosacárido) en el cual uno de los átomos de hidrógeno de un grupo hidroxilo (-OH) es reemplazado por otra molécula que generalmente presenta actividad biológica. Los glicósidos se presentan en abundancia en las plantas, algunos de ellos como pigmentos, y son usados en farmacología y en la industria de los colorantes, por mencionar algunos ejemplos.

<sup>2</sup> Algunas de las definiciones de *flavor* se refieren al conjunto de percepciones de estímulos olfativos y gustativos, táctiles y kinestésicos que permiten a un individuo identificar un determinado producto, por ejemplo un alimento. En el caso de los seres humanos, es posible en base a este atributo complejo establecer distintos niveles de agrado o desagrado y, por ende, de aceptabilidad.

<sup>3</sup> La capsaicina es un compuesto que presenta un anillo fenólico en su estructura, emparentado con los gingeroles. A la vez se trata de una sustancia nitrogenada donde el nitrógeno forma parte de una función amida. Su fórmula estructural ha sido presentada en el Capítulo 3 (Figura 14 del mencionado capítulo).

<sup>4</sup> La astringencia se describe como una sensación difusa de sequedad y aspereza que no se restringe a una región particular de la boca o de la lengua (Azeredo *et al.*, 2007:19).

<sup>5</sup> El término conjugación corresponde a la unión, principalmente a partir de una condensación, de varios compuestos monoméricos u oligoméricos, los cuales modifican notoriamente las propiedades del compuesto fenólico original. La conjugación puede producirse con carbohidratos, proteínas, lípidos, aminoácidos, aminas, ácidos carboxílicos, terpenoides, alcaloides o flavonoides.

<sup>6</sup> Cabe recordar que las lactonas son compuestos orgánicos del tipo de los ésteres cíclicos. Se originan a partir de la condensación de un grupo alcohol con un grupo ácido carboxílico dentro de una misma molécula.

<sup>7</sup> La radiación ultravioleta (UV) es una parte de la región no ionizante del espectro electromagnético que comprende aproximadamente el 8-9% del total de la radiación solar. Se la divide tradicionalmente en tres rangos de longitud de onda: UV-C (200-280 nm), que es extremadamente nociva para los organismos, pero no relevante bajo condiciones naturales de irradiación solar; UV-B (280-320 nm), de interés particular debido a que representa sólo aproximadamente el 1,5% del total del espectro, pero puede inducir diversos daños en las plantas; y UV-A (320-400 nm), correspondiendo al 6,3% de la radiación solar recibida, es la porción menos peligrosa de la radiación UV (Hollós, 2002).

<sup>8</sup> La termogénesis (liberación de calor) ha sido descrita en organismos vegetales en relación con las funciones de la oxidasa alternativa que opera en las mitocondrias vegetales. Bajo este mecanismo, las mitocondrias de las plantas son capaces de oxidar equivalentes de reducción sin generar un gradiente electroquímico de protones ni ATP. Algunas plantas en particular aprovechan este aspecto de la actividad oxidasa alternativa a fin de volatilizar compuestos químicos que actuarán como atrayentes de polinizadores. Se sabe que la termogénesis se verifica en flores de plantas Angiospermas pertenecientes a las familias *Annonaceae*, *Araceae*, *Aristolochiaceae*, *Cyclanthaceae*, *Nymphaeaceae* y *Palmae*. En la actualidad se relaciona también a la termogénesis con la resistencia a factores de estrés y la regulación del metabolismo del carbono.

## Bibliografía

- Azeredo, H. M. C.; Brito, E.S.; Damasceno, L. F.; Pinto, G. A. S. (2007). "Capítulo 3 - Taninos e sua correlação com efeitos nutricionais e sensoriais em alimentos". En: El método gravimétrico basado en la precipitación de fenoles mediante acetato de iterbio mide fenoles totales y fenoles no-taninos. Cassel, E. y Figueiró Vargas, R. M. (orgs.). *Aplicaciones Industriales de los Taninos Vegetales: Productos y Procesos*. Porto Alegre. Brasil. Programa CYTED – Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. EDIPUCRS.
- Baldwin, E. A.; Bai, J. (2011). "Chapter 4: Physiology of Fresh-Cut Fruits and Vegetables". En: El método gravimétrico basado en la precipitación de fenoles mediante acetato de iterbio mide fenoles totales y fenoles no-taninos. Martín-Belloso, O. y Soliva-Fortuny, R. (eds.) *Advances in Fresh-Cut Fruits and Vegetables Processing*. . Boca Raton, FL. USA. CRC Press. Taylor & Francis Group.
- Boué, S.; Carter, C.; Ehrlich, K.; Cleveland, T. (2000). "Induction of the Soybean Phytoalexins Coumestrol and Glyceollin by *Aspergillus*". *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2167-2172.
- Bowsher, C.; Steer, M.; Tobin, A. (2008). *Plant Biochemistry*. New York. USA. Garland Science. Taylor & Francis Group, LLC

- Cortés Benavides, F. (1986). *Cuadernos de Histología Vegetal*. Madrid. España. Editorial Marbán S. A.
- Croteau, R.; Kutchan, T. M.; Lewis, N. G. (2000). "Chapter 24: Natural Products (Secondary Metabolites)". En Buchanan, B. B.; Gruissem, W.; Jones, R. L. (eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville, USA. American Society of Plants Physiologists.
- Crozier, A.; Clifford, M. N.; Ashihara, H. (Eds.). (2006). *Plant secondary metabolites. Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Oxford. UK. Blackwell Publishing.
- Dalkin, K.; Edwards, R.; Edington, B.; Dixon, R. (1990). "Stress Responses in Alfalfa (*Medicago sativa* L.). 1. Induction of Phenylpropanoid Biosynthesis and Hydrolytic Enzymes in Elicitor-Treated Cell Suspension Cultures". *Plant Physiol.* 92, 440-446.
- Fahn, A. (1982). *Plant Anatomy*. New York. USA. Pergamon Press.
- Gil, M. I.; Tudela, J. A.; Espín, J. C. (2005). "Capítulo 8. Pardeamiento". En: González-Aguilar, G. A.; Gardea, A. A.; Cuamea-Navarro, F. (eds.) *Nuevas Tecnologías de Conservación de Productos Vegetales Frescos Cortados*. . Guadalajara, Jalisco, México. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) Proyecto XI.22 "Desarrollo de Tecnologías de Conservación de Productos Vegetales Frescos Cortados". CYTED.
- Hayat, S.; Ali, B.; Ahmad, A. (2007). "Salicylic acid: biosynthesis, metabolism and physiological role in plants". En Hayat, S. y Ahmad, A. (eds.). *Salicylic Acid- A Plant Hormone*. Dordrecht. The Netherlands. Springer.
- Heldt, H-W. (2005). *Plant Biochemistry*, Third Edition. MA, USA. Elsevier, Inc.
- Hollósy, F. (2002). "Effects of ultraviolet radiation on plant cells". *Micron* 33: 179-197.
- Jiang, S.; Singh, G. (1998). "Chemical Synthesis of Shikimic Acid and Its Analogues". *Tetrahedron* 54, 4697-4753.
- Lallana, V. H.; Lallana, M. del C. (2003). *Manual de Prácticas de Fisiología Vegetal* [en línea]. Consultado el 27 de diciembre de 2012 en: <[http://www.fca.uner.edu.ar/academicas/deptos/catedras/fisiologiaveg/m\\_didactico/manual\\_practicas/BDesarrolloED.pdf](http://www.fca.uner.edu.ar/academicas/deptos/catedras/fisiologiaveg/m_didactico/manual_practicas/BDesarrolloED.pdf)>.

- Makkar, H. P. S.; Siddhuraju, P.; Becker, K. (2007). *Methods in Molecular Biology*, vol. 393: *Plant Secondary Metabolites*. Totowa, NJ. USA. Humana Press Inc.
- Nelson, D. L.; Cox, M. M. (2009). *Lehninger Principios de Bioquímica. Quinta Edición*. Barcelona. España. Ediciones Omega.
- Nieves-Aldrey, J. L. (1998). "Insectos que inducen la formación de agallas en las plantas: una fascinante interacción ecológica y evolutiva". *Boletín SEA*, 23 3-12.
- Strack, D. (1997). "Chapter 10. Phenolic Metabolism". En: Dey, P. M.; Harborne, J. B (eds.). *Plant Biochemistry*. London. UK. Academic Press.
- Sollai, F.; Zucca, P.; Sanjust, E.; Steri, D.; Rescigno, A. (2008). "Umbelliferone and Esculetin: Inhibitors or Substrates for Polyphenol Oxidases?" *Biol. Pharm. Bull.* 31(12), 2187-2193.
- Taiz, L.; Zeiger, E. (1998). *Plant Physiology, Second Edition*. MA, USA. Sinauer Associates, Inc.
- Taiz, L.; Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology, Fifth Edition*. MA, USA. Sinauer Associates, Inc.
- Tilley, J.M.; Terry, R.A. (1963). "A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops". *J. Br. Grasslands Soc.* 18, 104-111.
- Vermerris, W.; Nicholson, R. (2006). *Phenolic Compound Biochemistry*. Dordrecht, The Netherlands. Springer.
- von Poser, G. L. (2007). "Capítulo 1 - Taninos: actividades biológicas". En Cassel, E. y Figueiró Vargas, R. M. (orgs.). *Aplicaciones Industriales de los Taninos Vegetales: Productos y Procesos*. Porto Alegre. Brasil. Programa CYTED - Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. EDIPUCRS.